



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Estudo sobre a detecção do Circovirus Aviário em psitacídeos
domésticos na região de Barcelona – Espanha.**

João Pedro dos Santos Carvalho Piçarra

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Maria Isabel Neto da Cunha
Fonseca

Mestre Jordi Grifols i Ronda

ORIENTADOR

Mestre Jordi Grifols i Ronda

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Isabel Neto da Cunha
Fonseca

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Estudo sobre a detecção do Circovirus Aviário em psitacídeos
domésticos na região de Barcelona – Espanha.**

JOÃO PEDRO DOS SANTOS CARVALHO PIÇARRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CLÍNICA DE NOVOS ANIMAIS DE COMPANHIA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Maria Isabel Neto da Cunha
Fonseca
Mestre Jordi Grifols i Ronda

ORIENTADOR

Mestre Jordi Grifols i Ronda

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Isabel Neto da Cunha
Fonseca

2009

LISBOA

Agradecimentos

Agradeço à FMV pelo facto de ter concedido esta oportunidade de enriquecer a minha formação.

Um obrigado muito especial à professora Isabel Neto pelo tempo perdido, pela paciência para ensinar e corrigir e pelo espírito crítico com que me ajudou a escrever a dissertação. Agradeço a toda a equipa do Hospital Zoològic Badalona, em particular ao Director Clínico e meu orientador de estágio, Dr. Jordi Grifols, pelo apoio à recolha extensiva de dados e informação e pela disponibilidade constante.

À minha família e amigos pelo apoio que nunca me faltou para continuar a trabalhar e concluir a tese e o mestrado.

Estudo sobre a detecção do Circovirus Aviário psitacídeos domésticos na região de Barcelona – Espanha.

Resumo

A dissertação aqui presente estuda pela primeira vez, a infecção pelo circovirus aviário (*Beak and Feather Disease Virus* - BFDV) em aves psitacídeas na região espanhola da Catalunha, entre 2005 e 2008.

O BFDV provoca a doença do bico e penas dos psitacídeos (*Psittacine Beak and Feather Disease* - PBFD), cuja apresentação clínica depende de vários factores relativos à ave infectada, ao ambiente e ao genótipo viral. A doença é observada em aves de cativeiro de todo o mundo e em aves selvagens de África e do Pacífico, colocando em risco a conservação de algumas espécies ameaçadas.

É apresentada uma revisão bibliográfica sobre o tema abordando a caracterização da doença em termos de etiologia, patogenicidade, quadros clínicos, diagnóstico, tratamento e profilaxia.

Através de amostras maioritariamente sanguíneas de 1348 animais de pelo menos 83 espécies diferentes, foi testada pelo método da reacção em cadeia da polimerase (PCR) a presença do DNA viral. Os animais estudados são na esmagadora maioria nascidos em cativeiro em países europeus e residentes da região.

Tendo em conta os resultados de estudos anteriores e de diferentes regiões geográficas, encontrou-se um valor de prevalência relativamente reduzido ($2,60\% \pm 0,8\%$). Certos grupos taxonómicos revelaram maior prevalência da infecção (*Ecletus* sp., *Agapornis* sp. *Ara* sp. e *Psittacus erithacus* ssp.), enquanto noutros não se encontraram animais positivos em todo o estudo. Não foi encontrada qualquer associação estatística entre a infecção por BFDV e o sexo ou a presença de *Chlamydophila* sp.

Foi estudado o quadro clínico de 26 animais positivos e foi possível observar que 49% não apresentavam sintomas no momento da colheita de sangue. O quadro clínico agudo apenas se observou em *Psittacus erithacus* ssp. e *Ecletus roratus* ssp.

Palavras-chave: Psitacídeos, PBFD, circovirus aviário, PCR, Espanha, Picacismo

Studies on the detection of Avian Circovirus in domestic psittacines in Barcelona region - Spain.

Abstract

This dissertation studies for the first time the avian circovirus (BFDV) infection in psittacine birds in the Spanish region of Catalonia, between 2005 and 2008.

BFDV is the etiologic agent of the Psittacine Beak and Feather Disease (PBFD), whose clinical presentation depends on various factors relative to the infected bird, environment and viral genotype. The disease is observed in captive birds worldwide and in wild birds in Africa and Pacific, putting at risk the conservation of some endangered species.

A literature review is presented approaching the etiology, pathogenicity, clinical presentation, diagnosis, treatment, and prophylaxis.

The presence of viral DNA was tested by PCR in blood samples from 1348 animals of about 83 different species. Most of the tested animals were captive born in European countries and living in Catalonia region.

Comparing to other similar studies and from different geographic regions, the prevalence value was relatively low ($2,60\% \pm 0,8$). Certain taxonomic groups revealed higher infection prevalence (*Ecletus* sp., *Agapornis* sp., *Ara* sp. e *Psittacus erithacus* ssp.), while in other species no positive birds were found in the whole study. No statistical relation was found between BFDV infection and sex or the presence of *Chlamydophila* sp.

The clinical presentation in 26 positive animals was studied and it was observed that 49% didn't show any symptoms at the moment of the blood sample collection. The acute clinical presentation was observed in *Psittacus erithacus* ssp. and *Ecletus roratus* ssp. species.

Keywords: Psittacine birds, PBFD, Avian circovirus, PCR, Spain, Feather plucking

Índice

1. Introdução	1
1.1 Ordem <i>Psittaciformes</i> – Generalidades	1
1.2 A importância da PBFD	2
1.3 Etiologia	3
1.4 Epidemiologia	6
1.5 Patogenia	9
1.6 Quadro Clínico	10
1.6.1 Infecção aguda	11
1.6.2 Infecção crônica	12
1.7 Diagnóstico	17
1.7.1 Histopatologia	17
1.7.2 Hemaglutinação e Inibição da Hemaglutinação	18
1.7.3 <i>Polymerase chain reaction</i>	19
1.7.4 Discussão	20
1.8 Tratamento e profilaxia	21
2. Material e métodos	23
3. Resultados e discussão	25
4. Conclusões	33
5. Bibliografia	36
Anexo 1 - Espécies de Psitaciformes incluídos no Apêndice I da CITES.	41
Anexo 2 - Valores de referência de hematologia para algumas espécies de psitacídeos (Fudge, 2000).	42

Índice de imagens

Imagem 1 - Papagaio Cinzento com alopecia localizada e penas displásicas com PCR sanguíneo positivo de BFDV.	15
Imagem 2 - Papagaio Cinzento apresentando alopecia e picacismo, devido a infecção crónica por BFDV, na totalidade das penas de cobertura, revestimento e vôo, à excepção da cabeça.	16

Índice de tabelas

Tabela 1 - Espécies do género Circovirus identificados que afectam aves	4
Tabela 2 - Espécies de aves afectadas pelo BFDV	7
Tabela 3 - Prevalências de PBFD calculadas nalguns estudos	8
Tabela 4 - Causas de picacismo em aves Psitacídeas	13
Tabela 5 - Resultados de PCR de BFDV agrupados por região de origem da espécie, com estimativas da respectiva prevalência e intervalos de confiança (I. C.) de 95%	25
Tabela 6 – Resultados de PCR de BFDV, tendo em conta os grupos taxonómicos considerados	26
Tabela 7 – Resumo estatístico das espécies em que se observou infecção por BFDV	27
Tabela 8 - Dados clínicos registados dos animais positivos	31

Lista de Abreviaturas e siglas

AST – Aspartato amino-transferase

AU – Ácido úrico

APV – *Avian polyomavirus*

BFDV – *Beak and feather disease virus*

CaCV – *Canary Circovirus*

CAV – *Chicken anemia vírus*

CITES - Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção

g/dl – gramas por decilitros de volume

DNA – ácido desoxirribonucleico

DuCV – *Duck Circovirus*

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EUA – Estados Unidos da América

FiCV – *Finch Circovirus*

GoCV – *Goose Circovirus*

GuCV – *Gull Circovirus*

HA – Hemaglutinação

HAU – Unidades de hemaglutinação

Hb – concentração de hemoglobina

HI – Inibição da hemaglutinação

IC – Índice de confiança

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza

kb – milhares de pares de bases de nucleótidos

kDa – *kilodalton*

MCH - *Mean corpuscular hemoglobin*

MCHC - *Mean corpuscular hemoglobin concentration*

µl - microlitro

nm – nanómetro

ORF – *open reading frame*

PBFD – *Psittacine beak and feather disease*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PiCV – *Pigeon Circovirus*

PWMS – *Post weaning multisystemic wasting syndrome*

RT-PCR – *Real Time Polymerase Chain Reaction*

RaCV – *Raven Circovirus*

v/v – volume em volume

WBC - *white blood cell count*

1. Introdução

A presente dissertação tem o objectivo de estudar a infecção por Circovirus Aviário (BFDV - *Beak and Feather Disease Virus*) em aves psitacídeas na região da Catalunha, em Espanha. Pela primeira vez esta doença é estudada na Península Ibérica.

O Circovirus Aviário é o agente etiológico da Doença do Bico e Penas dos Psitacídeos (PBFD - *Psittacine beak and feather disease*), e pertence ao género Circovirus e família *Circoviridae*.

Com base na detecção dos animais positivos pela técnica de PCR, calculou-se a prevalência da infecção nas aves psitacídeas naquela região. Foi estudado o quadro clínico dos animais onde se detectou o material genético viral. Os dados foram trabalhados estatisticamente de forma a poder ser estudada a prevalência nas diferentes espécies e grupos taxonómicos, assim como as apresentações clínicas da doença.

O objectivo deste trabalho é compreender a importância desta doença infecciosa nesta região e procurar estabelecer as melhores formas de a combater.

1.1 Ordem *Psittaciformes* – Generalidades

As aves psitacíformes são distinguidas da generalidade das restantes Ordens de aves através das suas características físicas e filogenéticas e estão actualmente identificadas cerca de 350 espécies.

As principais características que as distinguem das outras espécies de aves são o facto de serem aves zigodáctilas (possuem nos membros pélvicos dois dedos orientados cranealmente e dois dedos orientados caudalmente); o bico é adunco e frequentemente de grandes dimensões; possuem uma região denominada cera, onde se abrem as narinas (Forshaw, 2006).

As aves psitacídeas estão presentes no estado selvagem maioritariamente nas regiões tropicais e no Hemisfério Sul. Distribuem-se por todos os continentes à excepção da Europa e da Antárctida. Na Europa, a presença de psitacíformes ao longo dos tempos, foi-se devendo a importações de onde têm resultado alguns bandos de animais livres de espécies exóticas. Os animais dos géneros *Psittacula*, *Myiopsita* e *Aratinga* são dos que melhor se adaptam aos ambientes temperados urbanos da Península Ibérica (Lennox e Harrison, 2006; Matias, 2002).

Historicamente, o ser humano tem demonstrado um especial interesse pelos psitacíformes, explorando a sua beleza, inteligência e sociabilidade. De facto, há registos desde o Império

Romano e Civilização Egípcia da manutenção de papagaios como animais de companhia. Mais tarde, no século XV, os companheiros de Cristóvão Colombo, à chegada ao Continente Americano, depararam-se com papagaios mantidos nas habitações dos indígenas como animais de companhia (Pepperberg, 2008; Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira, 1960).

A utilização destas aves, em exposições de treino e beleza física, tem sido uma actividade constante na História e mantém-se hoje em dia em parques zoológicos.

A capacidade de aprendizagem, raciocínio lógico e numérico, produção de linguagem vocal, e criatividade de algumas espécies, é alvo de diversos estudos e publicações. De facto, em muitos aspectos, as capacidades intelectuais destes animais chegam a ser comparáveis às dos cetáceos, grandes símios e do próprio ser humano. Irene Pepperberg (2006) compilou algumas capacidades de lógica no papagaio cinzento africano (*Psittacus erithacus*), e foi autora de dezenas de outros estudos sobre o desempenho intelectual de aves desta espécie (Pepperberg, 2008).

A destruição de habitats e a captura massiva de aves selvagens conduziu à ameaça da conservação ou mesmo à extinção de muitas espécies. Assim, a generalidade dos psitacíformes foi incluído no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES), de forma a regular o comércio destes animais. Por esta razão, a sua captura está proibida, excepto em situações particulares que a justifiquem, e apenas os animais acompanhados de certificados de origem podem ser comercializados e detidos fora do habitat selvagem dos mesmos. Algumas espécies foram colocadas no Apêndice I e são alvo de legislação protectora mais restritiva por se encontrarem ameaçadas de extinção (CITES, 2009). No Anexo 1 da presente dissertação estão referidas as espécies de psitacídeos que não estão incluídas no Apêndice II da CITES.

A aplicação da legislação internacional levou a que hoje em dia, nos países desenvolvidos, se tenham desenvolvido estruturas para a reprodução e criação de aves que podem ser posteriormente comercializadas como animais domésticos, satisfazendo a procura da sociedade.

1.2 A importância da PBFD

A PBFD é, actualmente, uma das doenças víricas mais significativas dos psitacíformes e pode infectar um grande número de espécies pertencentes a esta Ordem taxonómica.

A forma clássica da infecção por Circovirus aviário foi descrita em várias espécies de catatus selvagens australianas no início dos anos 70 por Ross Perry, embora já houvesse relatos do séc. XIX sobre anomalias da plumagem sugestivas desta doença (Gerlach 1994). Através da exportação de aves infectadas e das deslocções de aves selvagens, o vírus espalhou-se por todo o Mundo, incluindo Portugal e Espanha. Surtos desta doença infecto-contagiosa têm causado grandes prejuízos económicos aos proprietários e criadores de psitacídeos.

A PBFD pode colocar em risco a conservação de algumas espécies na Austrália, Nova Zelândia e África, consideradas vulneráveis ou em risco de extinção pela União Internacional da Conservação da Natureza (IUCN). Na Austrália existe mesmo uma importante preocupação governamental com a dispersão e consequente prejuízo ambiental relacionado com o BFDV (Borthwick, 2005).

O Inseparável de Peito-Preto (*Agapornis nigrigenis*), o Papagaio do Cabo (*Poicephalus robustus*) e o Periquito-andorinha (*Lathamus discolor*) são exemplos de animais em risco de extinção afectados pela PBFD. Esta última espécie pode mesmo ser afectada por um genótipo próprio do vírus filogeneticamente relacionado com os genótipos que afectam lorídeos. Este assunto será discutido com maior detalhe no ponto 1.3 da presente dissertação (Heath et al., 2004; Khalesi et al., 2005).

1.3 Etiologia

O agente etiológico da PBFD foi definitivamente identificado no final dos anos 80 (Ritchie, B. W., Niagro, Lukert, Steffens & Latimer, 1989) e incluído na Família *Circoviridae* e Género *Circovirus*. A este género pertence também o Circovirus porcino (PCV-1 e PCV-2), causador do PWMS (*post weaning multisystemic wasting syndrome*) e outros Circovirus aviários (alguns estão apresentados na Tabela 1).

A Família *Circoviridae* possui ainda dois outros géneros:

- O género *Gyrovirus* – o único elemento é o vírus da anemia infecciosa da galinha (CAV-1);
- O género *Geminivirus* – é constituído por diversos vírus que afectam plantas.

A infecção por CAV-1 nas galinhas apresenta um padrão de patogenia algo diferente do BFDV e do PCV mas é o Circovirus mais bem estudado neste momento, pelo que o seu conhecimento é importante para o estudo do circovirus dos psitacídeos (Bassami, Berryman, Wilcox & Raidal, 1998).

O BFDV é um vírus com um genoma de 1,7 a 2,3 kb de cadeia simples de DNA circular (dos mais pequenos entre os vírus patogénicos conhecidos) envolvido por uma cápside esférica ou icosaédrica, com um diâmetro de 14 a 21 nm ou 16 a 26 nm, consoante os autores. O

vírus não possui invólucro (Ritchie, 1995; Albertyn, Tajbhai & Bragg 2004; Heath et al., 2004; Raue et al. 2004).

O genoma deste vírus possui 7 *open reading frames* (ORF) que podem codificar sete proteínas diferentes. Foram identificadas três ORF na cadeia do sentido paralelo (V1, V2 e V3) e quatro na cadeia do sentido complementar anti-paralelo (C1, C2, C3 e C4) (Raue et al. 2004). As duas ORF de maiores dimensões são denominadas ORF V1 e ORF C1, de acordo com a cadeia onde se localizam.

Actualmente sabe-se que a ORF V1 (de maiores dimensões) codifica uma proteína associada à replicação viral extremamente semelhante à proteína replicase encontrada no circovirus porcino (proteína *rep*). A ORF C1 aparentemente codifica uma proteína da cápside, também ela semelhante à encontrada no circovirus porcino (de Kloet & de Kloet, 2004).

Tabela 1 - Espécies do género Circovirus identificados que afectam aves (Stewart, Perry & Raidal, 2006; Todd, 2004; Todd, et al. 2007, Hattermann, Schmitt, Stoike & Mankertz, 2003).

Espécie de circovirus	Espécie(s) afectada(s)
BFDV	Psitacídeos
PiCV	Pombo (<i>Columba livia</i>)
GoCV	Ganso (<i>Anser</i> spp.)
CaCV	Canário (<i>Serinus canaria</i>)
RaCV	Corvo Australiano (<i>Corvus coronoides</i>)
GuCV	Gaivota prateada (<i>Larus argentatus</i>)
FiCV	Diamante de Gould (<i>Chloebia gouldiae</i>)
DuCV	Pato (<i>Anas</i> spp.)

Estas duas proteínas estão identificadas no circovirus dos psitacídeos e têm sido estudadas em diversas ocasiões (Khalesi, 2007; Ritchie et al. 1990a). A proteína da replicação possui entre 26 e 33 kDa e a proteína da cápside possui entre 23 e 28,9 kDa (Bassami et al. 1998; Khalesi, 2007; Ritchie et al. 1990a).

Segundo alguns autores podem identificar-se três proteínas diferentes em amostras virais. As proteínas separadas por electroforese de gel de poliacrilamida possuem 26,3 kDa, 23,7 kDa e 15,9 kDa (Khalesi, 2007; Ritchie et al. 1990a).

O papel das restantes ORF não está ainda bem definido no BFDV e na produção de proteínas e apresentam menor conservação no genoma viral (Raue et al. 2004; de Kloet e de Kloet, 2004).

Têm sido definidos diferentes genótipos e/ou estirpes com base nas variações da sequência de DNA. Foram encontradas variações totais até cerca de 20% (Khalesi et al., 2005; Phalen, 2006; Raue et al. 2004).

A ORF V1 mostrou ser altamente conservada entre todos os circovirus aviários. A sequência de nucleótidos incluída na ORF V1 é extremamente semelhante nos circovirus isolados por de Kloet e de Kloet (2004), embora tenham sido detectadas algumas variações.

A proteína da replicação codificada pela ORF V1 apresenta entre 86,9% e 98,3% de identidade na sequência de amino-ácidos. Por sua vez, a proteína da cápside apresenta apenas entre 76,3% e 83,3% de conservação da sequência de amino-ácidos. Estas variações são encontradas comparando proteínas isoladas de genótipos distintos (Raue et al., 2004).

A variação genética viral tem uma relação complexa com a geografia e a(s) espécie(s) de ave(s) afectadas. Actualmente, aceita-se a existência de diferentes genótipos ou estirpes mais ou menos adaptadas às famílias Loriidae, Cacatuidae e Psittacidae. Apesar desta tendência para a relação entre genótipo e ave, não foram encontrados casos de especificidade na interacção entre uma estirpe viral e determinado hospedeiro (Ritchie, Anderson & Lambert, 2003b; Heath et al., 2004, de Kloet & de Kloet, 2004; Khalesi et al., 2005; Phalen 2006).

O BFDV é um circovírus hemaglutinante que permite a análise por hemaglutinação (HA) e, consequentemente, por inibição da hemaglutinação (HI). A primeira técnica permite a detecção do antígeno BFDV em amostras de produtos biológicos processados. A HI permite a detecção de anticorpos neutralizantes do antígeno em amostras sanguíneas (Gerlach 1994). A hemaglutinação não é uma característica específica do BFDV e será discutida mais aprofundadamente no ponto 1.7.2.

1.4 Epidemiologia

A generalidade dos autores considera que a doença é enzoótica nas populações selvagens de catatuas australianas e que, depois de instalada neste continente foi-se espalhando pelo resto do Mundo (Gerlach, 1994). Segundo outros autores, a origem geográfica da doença continua por determinar, sugerindo-se que possa mesmo ser o continente africano, pois há registo de infecção de psitacídeos selvagens neste continente, nomeadamente em animais do género *Poicephalus* e *Agapornis* (Styles, 2005).

A PBFD é uma doença caracterizada por afectar menos as aves do Novo Mundo (Hemisfério Ocidental - Continente Americano) do que aquelas originárias do Hemisfério Oriental (aves do Velho Mundo – África, Australásia e Pacífico) (Gerlach, 1994; Bert, Tomassone, Peccati, Navarrete & Sola, 2005).

O BFDV foi identificado em aves selvagens da Austrália, Pacífico e África e em animais de cativeiro em todo o Mundo. Tal como referido anteriormente, a doença é mais rara em psitacídeos americanos e pensa-se que estes têm maior resistência à infecção (Greenacre, 2005; Phalen, 2006).

Desde os anos 50 que a exportação de aves selvagens australianas está proibida, sendo a presença de Circovirus na região uma das razões, para além da preocupação com a conservação das espécies e habitats (Macwhirter, 1998). De facto, crê-se que o principal factor responsável pela disseminação global do vírus tem sido o comércio de aves (Phalen, 2006). A existência de animais portadores assintomáticos e o contacto entre animais de diferentes espécies, origens e idades permite e facilita a dispersão da doença (Khalesi, 2007).

Até ao momento, foram descritas infecções por circovirus aviário numa enorme variedade de espécies de psitacídeos, de onde se destacam as catatuas, papagaios ecléticos (*Ecletus roratus*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e lorídeos na Australásia e Pacífico. Os papagaios cinzentos (*Psittacus erithacus*) e inseparáveis (*Agapornis* spp.) são as espécies africanas mais afectadas. Na Tabela 2 apresentam-se as espécies documentadas susceptíveis de infecção por BFDV.

Os quadros assintomáticos são mais frequentemente associados aos *Agapornis* spp. e a infecção nestes animais pode apresentar prevalências extremamente elevadas (Phalen, 2006).

Tabela 2 - Espécies de aves afectadas pelo BFDV (Heath et al., 2004; B. W. Ritchie, 1995; de Kloet & de Kloet, 2004; Tomasek & Tukac 2007; Rahaus et al., 2008b)

Psittacidae		Cacatuidae
Arara azul e amarela (<i>Ara ararauna</i>) ¹	Periquito cornudo (<i>Eunymphicus cornutus</i>)	Catatua branca (<i>Cacatua alba</i>) ¹
Arara escarlate (<i>Ara macao</i>)	Periquito de asas douradas (<i>Psephotus chrysoterygius</i>)	Catatua das Molucas (<i>Cacatua moluccensis</i>)
Arara militar (<i>Ara militaris</i>)	Periquito de Bourke (<i>Neopsephotus bourkii</i>)	Catatua das palmeiras (<i>Probosciger aterrimus</i>)
Arara vermelha (<i>Ara chloroptera</i>)	Periquito de colar (<i>Psittacula krameri</i>)	Catatua de bico comprido (<i>Cacatua tenuirostris</i>)
Jandaia de testa vermelha (<i>Aratinga auricapilla</i>)	Periquito de colar de Manila (<i>Psittacula manillensis</i>)	Catatua de crista amarela (<i>Cacatua galerita</i>) ¹
Jandaia-Sol ou amarela (<i>Aratinga solstitialis</i>)	Periquito de dorso vermelho (<i>Psephotus haematonotus</i>)	Catatua de crista citrina (<i>Cacatua citrinocristata</i>)
Maitaca-verde (<i>Pionus maximiliani</i>)	Periquito do príncipe de Gales (<i>Polytelis alexandrae</i>)	Catatua de Galah ou de peito-rosa (<i>Eolophus roseicapillus</i>)
Papagaio cinzento (<i>Psittacus erithacus</i>) ¹	Periquito de Bluebonnet (<i>Psephotus haematogaster</i>)	Catatua de Goffin (<i>Cacatua goffini</i>)
Papagaio de barriga-laranja (<i>Neophema chrysogaster</i>)	Periquito encapuzado (<i>Psephotus dissimilis</i>)	Catatua de Mitchell ou de leadbeater (<i>Cacatua leadbeateri</i>)
Papagaio de frente-vermelha (<i>Amazona autumnalis</i>)	Periquito Port Lincoln (<i>Barnardius zonarius</i>)	Catatua filipina (<i>Cacatua haematuropygia</i>)
Papagaio de frente azul (<i>Amazona aestiva</i>) ¹	Periquito rei (<i>Alisterus scapularis</i>)	Catatua gang-gang (<i>Callocephalon fimbriatum</i>)
Papagaio de frente branca (<i>Amazona albifrons</i>) ¹	Rosela azul ou pálida (<i>Platycercus adscitus</i>)	Catatua sanguínea ou pequena (<i>Cacatua sanguinea</i>)
Papagaio de cabeça castanha (<i>Poicephalus c. cryptoxanthus</i>)	Rosela do Leste (<i>Platycercus icterotis</i>)	Catatua triton (<i>Cacatua triton</i>)
Papagaio de ventre vermelho (<i>Poicephalus rufiventris</i>)	Rosela do Norte (<i>Platycercus venustus</i>)	Caturra (<i>Nymphicus hollandicus</i>)
Papagaio do Cabo (<i>Poicephalus robustus</i>)	Rosela elegante (<i>Platycercus elegans</i>)	Loridae
Papagaio do Senegal (<i>Poicephalus senegalus</i>) ¹	Rosela multicolorida (<i>Platycercus eximius</i>)	Lório arco-íris (<i>Trichoglossus haematodus</i>)
Papagaio Meyer (<i>Poicephalus meyeri</i>)	Inseparável de Angola (<i>Agapornis roseicollis</i>)	Lório chlorocercus (<i>Lorius chlorocercus</i>)
Papagaio preto (<i>Coracopsis nigra</i>)	Inseparável de Madagáscar (<i>Agapornis cana</i>) ¹	Lório de Mitchell (<i>Trichoglossus haematodus mitchellii</i>)
Papagaio vasa (<i>Coracopsis vasa</i>)	Inseparável de faces negras (<i>Agapornis nigrigenis</i>)	Lório reticulado ou de crista-azul (<i>Eos reticulata</i>)
Papagaio-eclétus (<i>Eclectus roratus</i>) ¹	Inseparável de Fisher (<i>Agapornis fischeri</i>)	Lóris de Goldie (<i>Psitteuteles goldiei</i>)
Periquito-andorinha (<i>Lathamus discolor</i>)	Inseparável de Nyassa (<i>Agapornis lilianae</i>)	Outras
Periquito australiano (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	Inseparável mascarado ou da Tanzânia (<i>Agapornis personatus</i>)	Rola do Senegal (<i>Streptopelia senegalensis</i>)
Periquito Barnardi (<i>Barnardius barnardi</i>)		

¹ Espécies onde foi observada infecção no presente estudo

Os dados publicados sobre a prevalência de PBFD apresentam resultados variáveis consoante a região geográfica, a(s) espécie(s) estudada(s) e a técnica de análise aplicada, conforme podemos observar na Tabela 3. Alguns resultados apresentados não são muito claros no que respeita à metodologia de diagnóstico e aos animais estudados (Ritchie, 1995).

A prevalência em países europeus foi estudada por Rahaus e Wolff (2003) e por Bert et al. (2005). Rahaus e Wolff (2003) determinaram uma prevalência da infecção de 39,2% através da testagem por PCR da ORF V1 de penas em aves psitacídeas na Alemanha numa amostra de 142 animais.

Tabela 3 - Prevalências de PBFD calculadas nalguns estudos

País	Prevalência	Método	Espécie(s)	Fonte
Austrália	50%	N/A*	Rosella crimson selvagens	Ritchie, 1995
Austrália	41-94%	IH	Catatuas selvagens	Raidal, McElnea & Cross, 1993
Austrália	75%	Sintomas	<i>Cacatua galerita</i> domésticas	Ritchie, 1995
EUA	5%	PCR sangue	Várias	Dahlhausen e Radabaugh, 1997
Alemanha	39,2%	PCR penas	Várias	Rahaus & Wolff, 2003
Itália	8,05%	PCR sangue e penas	Várias	Bert et al., 2005
Austrália	23%	PCR penas	Várias com suspeita de infecção	Khalesi et al., 2005
Taiwan	41,2%	PCR	Várias	Hsu, Ko & Tsaia, 2006
EUA	40-60%	PCR	Agapornis spp.	Phalen, 2006
EUA	3-5%	PCR	Papagaios Novo Mundo	Phalen, 2006
Austrália	18,85%	PCR penas	Várias com suspeita de infecção	Khalesi, 2007
Nova Zelândia	3%	PCR penas e sangue	Várias espécies autóctones	Ha, Alley, Cahill, Howe & Gartrell, 2009
(*) – N/A = não apresentado				

Em 2005, Bert et al., determinaram um valor mais reduzido para a prevalência de PBFD em Itália – 8,05%, numa amostra de 1516 animais. Estes autores realizaram análises de PCR da ORF V1 de sangue de animais vivos e, ocasionalmente, de penas do ninho onde permaneceram crias que faleceram com suspeita de PBFD.

A discrepância entre estes dois resultados dever-se-á principalmente à natureza do material biológico onde foi testado (penas e sangue) e à diferença no tamanho das amostras. De facto, essas diferenças não permitem sequer que se comparem os resultados obtidos nas duas publicações (Bert et al., 2005).

Os dois estudos realizados na Europa apresentaram prevalências elevadas e bastante preocupantes, especialmente devido ao facto de muitas crias poderem falecer com o quadro agudo da doença sem se chegar a um diagnóstico que possa entrar no cálculo da prevalência (Bert et al., 2005). A propagação deste vírus nos países europeus poderá assim estar bastante descontrolada e continuar a provocar perdas para todos os criadores e amantes de psitacídeos (Bert et al., 2005).

1.5 Patogenia

O vírus é eliminado dos animais infectados através das penas e pó das plumas de descamação (naturalmente abundantes nalgumas espécies), das fezes e das secreções do papo (Gerlach, 1994; Phalen, 2006).

A transmissão pode ocorrer por inalação ou ingestão de partículas virais ou, possivelmente, devido à movimentação do vírus através do epitélio folicular da bolsa de Fabricius (Phalen, 2006). A transmissão vertical da doença foi recentemente demonstrada em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e papagaios de cabeça castanha (*Poicephalus cryptoxanthus cryptoxanthus*) onde 20% (n=15) dos ovos embrionados descendentes de adultos infectados demonstraram a presença no seu interior do BFDV por PCR (Rahaus et al., 2008b). No mesmo estudo foi demonstrada a presença do vírus em crias filhas de indivíduos portadores.

Nos locais onde permaneceram aves infectadas, o pó ambiental pode ser uma importante fonte de contágio, visto que a concentração de viriões chega a ser bastante elevada em amostras analisadas (Gerlach, 1994). O BFDV pode permanecer viável em fómites por períodos relativamente prolongados (Doneley 2003).

Geralmente são infectadas as aves com menos de três anos, mas animais até 20 anos podem apresentar sintomas de PBFD. Os animais mais velhos com lesões da plumagem poderão ter sido infectados em idade jovem e permanecem com infecção latente (Gerlach, 1994).

Conforme a espécie, idade, via de infecção, estado imunológico da ave, título de anticorpos e antígenos e o genótipo do vírus, é determinado o quadro clínico (Ritchie, 1995; Raue et al., 2004). O período de incubação varia entre 2 a 4 semanas, quando são infectadas crias, até meses ou anos, no caso dos adultos (Phalen, 2006).

O vírus replica-se numa grande variedade de tecidos onde haja células em divisão (Stanford, 2004). Foi demonstrada a presença no timo, bolsa de Fabrício, baço, papo, esófago, intestino, fígado, pele, penas, cérebro e leucócitos circulantes (Gerlach, 1994; Phalen, 2006; de Kloet & de Kloet, 2004).

A displasia das penas resulta da necrose e ruptura do colar epidérmico, epiderme basal intermédia e polpa das penas, assim como de lesões de trombose e hemorragia no interior do próprio folículo, induzidas pelo vírus. As lesões do bico ocorrem por um processo semelhante ao nível do epitélio germinativo deste órgão (Phalen, 2006).

A necrose dos órgãos linfóides e dos leucócitos circulantes resulta num quadro imunossupressivo em que as infecções secundárias são comuns e podem conduzir a uma septicémia fatal (Phalen, 2006).

Uma ave portadora provavelmente poderá eliminar o vírus antes de demonstrar quaisquer sintomas ou mesmo sem nunca os revelar, estabelecendo-se um quadro clínico silencioso. Os inseparáveis (*Agapornis* sp.) são os animais que mais frequentemente apresentam a infecção assintomática (Phalen, 2006).

Nos animais infectados assintomaticamente, crê-se que o vírus persista nas penas e células epiteliais, afectando assim em menor grau outros órgãos vitais da ave (Greenacre, 2005; Hess, Scope & Heincz 2004).

1.6 Quadro clínico

A infecção por circovírus pode manifestar-se sintomaticamente segundo dois quadros clínicos distintos – o quadro agudo e crónico. O quadro silencioso dos portadores assintomáticos é a outra forma de infecção conhecida (Phalen, 2006).

Outros autores consideram três tipos de infecção – hiperaguda, aguda e crónica (Ritchie, 1995; Greenacre, 2005) – dividindo o quadro que aqui se considera agudo em duas formas, consoante a idade da ave e a evolução e a gravidade da ocorrência dos sintomas.

Estudos efectuados demonstraram que a infecção latente assintomática pode ser bastante frequente em algumas espécies de psitacídeos da Oceania e Pacífico, onde se observaram grandes discrepâncias na relação entre indivíduos doentes e indivíduos infectados (Ritchie, 1995).

Bert et al. (2005) ao estudarem a presença de PBFD em animais de cativeiro em Itália também encontraram uma grande prevalência de animais psitacíformes infectados de forma latente.

Os inseparáveis (*Agapornis* spp.), originários de África, são reconhecidamente, com muita frequência, portadores assintomáticos do BFDV. As espécies americanas raramente apresentam sinais de doença quando infectados e os periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) também são em muitas situações portadores assintomáticos do BFDV (Phalen, 2006).

1.6.1 Infecção aguda

O quadro agudo observa-se nos animais mais jovens onde não houve ainda involução da bolsa de Fabricius (Stanford, 2004). Os animais com menos de um ano estarão particularmente susceptíveis a este quadro que é especialmente comum em papagaios cinzentos incubados e criados à mão (Doneley, 2003; Phalen, 2006). Os animais criados pelos seus progenitores poderão desenvolver o seu sistema imunitário de forma mais competente. O contacto com a flora do material do ninho e dos excrementos, assim como com as secreções digestivas das aves adultas poderão estimular e desenvolver melhor o sistema imunitário (Crosta, 2008).

A susceptibilidade da ocorrência do quadro clínico agudo nos animais jovens está mais relacionada com condicionantes inerentes às aves do que referentes a propriedades antigénicas ou genotípicas virais (Ritchie et al. 2003b).

Consoante a espécie do animal infectado, a forma aguda pode ser rapidamente fatal. Este tipo de infecção ocorre em papagaios cinzentos africanos (*Psittacus erithacus*), catatua-de-crista-amarela (*Cacatua galerita*) e catatua-branca (*Cacatua alba*) (Phalen, 2006).

Nos papagaios cinzentos a forma aguda do PBFD é praticamente sempre fatal (Stanford, 2004).

Em espécies tais como a catatua-Galah (*Eolophus roseicapillus*), a infecção dos animais jovens pode ter tendência a evoluir para a forma crónica (Phalen, 2006).

Nos animais juvenis (em particular da espécie *Psittacus erithacus*) ocorre uma depleção leucocitária devido à infecção da medula óssea e dos leucócitos circulantes. Isto resulta numa leucopénia muito marcada (Schoemaker et al., 2000). A imunossupressão deixa o animal susceptível a infecções secundárias (bacterianas, fúngicas e virais) que normalmente acabam por provocar a morte do animal (Doneley, 2003; Phalen, 2006).

A Aspergilose é, para alguns autores, a infecção secundária mais frequente resultante da imunossupressão (Niagro, 1990).

Segundo Doneley (2003), a hepatite por Adenovirus é uma infecção secundária que ocorre devido à imunossupressão causada pelo quadro agudo da infecção por circovirus aviário.

Os sintomas iniciais geralmente são inespecíficos e incluem depressão, letargia, regurgitação e anorexia (Phalen, 2006). Enterite, pneumonia, hepatite necrótica focal, septicémia, perda aguda de peso e morte são processos frequentemente observadas nos animais acometidos. Nalguns casos, a ave pode apresentar simplesmente história de diarreia e estase do papo que a conduz à morte em menos de 2 semanas (Ritchie, 1995).

O quadro agudo pode vir ou não acompanhado de lesões da plumagem, que não são frequentes nos papagaios cinzentos. Nas catatuas, as lesões das penas desenvolvem-se rapidamente e são semelhantes às da forma crónica ou, mais frequentemente, consistem em bandas constritoras anulares junto à base da haste, que provocarão a sua quebra e hemorragia (Gerlach, 1994).

As crias de catatuídeos infectados normalmente recusam ser tocadas e manejadas, pois a dor nos folículos das penas é bastante intensa. As lesões mais severas observam-se nos animais infectados antes da plumagem definitiva ter começado a substituir a de neonato (Gerlach 1994).

Os animais doentes podem apresentar, tal como referido anteriormente, uma leucopénia severa (<1000 leucócitos/ μ l) e os papagaios cinzentos podem também apresentar anemia severa (14-25%) (Greenacre, 2005; Phalen, 2006).

Apesar das lesões hepáticas serem também frequentes, as provas bioquímicas frequentemente não demonstram correlação com as mesmas (Phalen, 2006, Schoemaker et al. 2000).

O tratamento sintomático revela-se praticamente sempre infrutífero e a septicemia por bactérias e fungos oportunistas é frequentemente apontada como causa de morte (Schoemaker et al. 2000; Doneley, 2003; Niagro 1990).

1.6.2 Infecção crónica

A infecção crónica é aquela que é há mais tempo conhecida e que manifesta a sintomatologia clínica que dá o nome à doença do bico e penas. O quadro é progressivo e os primeiros sintomas normalmente aparecem entre os 6 meses e os 3 anos, tendo as aves maioritariamente mais de 8-10 meses (Phalen, 2006).

Os primeiros sinais podem ser muito subtis e consistir num atraso na muda da plumagem ou numa simples falta de pó no bico. De qualquer forma, normalmente, a inspecção detalhada destes animais revela já algumas penas com desenvolvimento anormal (Phalen, 2006).

As anormalidades na plumagem e o picacismo não são específicos de PBFD e podem ter muitas outras causas, apresentadas na Tabela 4. A abordagem clínica de uma ave que apresente picacismo ou auto-mutilação é complexa e exige conhecimento e experiência por parte do clínico, assim como uma boa cooperação por parte dos proprietários das aves. O diagnóstico assertivo é fundamental para atingir a cura destas aves e passa frequentemente pela testagem da presença do BFDV nas penas ou no sangue circulante (Molina, Grífols, Martinez-Silvestre e Padrós, 2002).

As causas orgânicas de picacismo são mais frequentes, de uma forma geral, nas espécies de pequeno porte (Periquitos e caturras, por exemplo). Os distúrbios comportamentais, por sua vez, são mais frequentes nas aves de maior porte (onde se destacam as catatuas e Papagaios cinzentos) (Montesinos, 2007). O picacismo/automutilação comportamental pode ser classificado como uma desordem obsessivo-compulsiva quando o comportamento de higiene da plumagem se torna numa conduta repetitiva e estereotipada (Grífols, 2008).

Tabela 4 – Causas de picacismo em aves Psitacídeas (Grífols, 2008; Chitty, 2005; Cooper & Harrison, 1994; Montesinos, 2007)

Causas Orgânicas	Causas Ambientais	Causas Comportamentais
<ul style="list-style-type: none"> - Processo de muda normal - Polyomavirus (APV) - Hipotiroidismo - Carências nutricionais (Vitamina A e aminoácidos essenciais) - Doença hepática (metabólica ou infecciosa) - Folliculite (Fúngica, bacteriana, por clamídeas ou viral) - Parasitas (internos e externos) - Processos alérgicos (atopia, alergia alimentar) - Neoplasias cutâneas - Aspergilose sistêmica - Clamidiose - Aerossaculite bacteriana - Doença que produza dor (artrites, outras) - Apresentação clínica de PBFD 	<ul style="list-style-type: none"> - Humidade relativa baixa - Irritantes ambientais - Falta de banhos - Má higiene das instalações - Alterações do fotoperíodo 	<ul style="list-style-type: none"> - Demasiado stress (presença de humanos e de outros animais, acumulação de más experiências, medo...) - Excesso de tempo livre - Sexual - frustração ou demasiada estimulação hormonal - Comportamento de postura

Entre as causas orgânicas incluem-se as carências nutricionais (ácidos aminados, minerais e/ou vitaminas), a presença de parasitas internos e externos, afecções hepáticas, processos dolorosos e infecções sistémicas crónicas. Montesinos (2007) refere a possibilidade de processos alérgicos na ocorrência de picacismo em psitacídeos adultos. É referida a atopia e as alergias alimentares como fonte de inflamação cutânea, prurido e consequente picacismo.

O contacto frequente com substâncias tóxicas ambientais pode danificar a pele e provocar prurido o que conduz a lesões da plumagem e a picacismo. Pelas mesmas razões, a falta de banhos e a baixa humidade ambiental pode provocar os mesmos sintomas (Molina et al., 2002; Montesinos, 2007).

Os distúrbios psicológicos conduzem frequentemente ao comportamento de picacismo e automutilação. O aborrecimento, medo e stress e a frustração sexual são as principais causas destes distúrbios (Montesinos, 2007).

No caso da apresentação crónica da PBFD, as lesões afectam as plumas de revestimento interno e as penas de contorno, mas podem ser predominantes numas ou noutras. As lesões são normalmente detectadas inicialmente no processo de muda. É normal ocorrer evolução para um padrão simétrico (Gerlach, 1994).

Numa fase inicial apenas são afectadas as penas de revestimento tal como se observa na Imagem 1. Normalmente, só posteriormente são afectadas as penas primárias (rémiges e rectrizes) (Greenacre, 2005).

Imagem 1 - Papagaio Cinzento com alopecia localizada e penas displásicas com PCR sanguíneo positivo de BFDV.



As anormalidades da plumagem agravam-se normalmente de uma muda para a seguinte e tendem a evoluir para a ausência de penas de contorno ou alopecia completa da ave (Imagem 2).

Apesar de haver um padrão de lesões mais ou menos clássico, existem frequentemente variações substanciais na sequência e modo de afecção da plumagem (Gerlach, 1994).

As penas afectadas apresentam graus variados de displasia: hiperqueratose e constrição da haste, linhas de *stress*, propensão a fracturas, tamanho anormalmente curto, adelgaçamento da haste, hemorragia no interior do cálam, penas em caracol, incapacidade de exteriorização da bárbula, plumagem anormalmente escura, ou mesmo uma displasia tão severa que não se conseguem distinguir as estruturas da pena e observa-se apenas uma massa aglomerada de queratina (Gerlach, 1994).

Nos periquitos australianos podem não se detectar lesões na plumagem, à excepção do desenvolvimento incompleto das rémiges das asas (denominada frequentemente de *French Molt* – Muda francesa). As aves silvestres podem apresentar coloração castanha da pele, provavelmente por excessiva exposição solar da mesma. Nos casos mais antigos pode

observar-se aplasia folicular mais ou menos dispersa (Phalen, 2006; Greenacre, 2005; Gerlach, 1994; Doneley, 2003).

Nos papagaios cinzentos pode observar-se o aparecimento de penas avermelhadas (“penas de conure”) intercaladas com as penas cinzentas, o que não é, no entanto, específico de PBFD (Gerlach, 1994).

O bico é afectado mais raramente e normalmente só depois de surgirem lesões nas penas (Gerlach, 1994). Neste órgão pode-se observar um crescimento anormal, resultado da degeneração da epiderme e estrato córneo. A presença de hiperqueratose que provoque o alongamento do bico pode ser um sinal precoce, seguido do aparecimento de fissuras longitudinais que se desenvolvem na queratina. Numa fase posterior o bico pode fracturar-se, ou soltar-se, expondo tecido necrótico e osso sob a camada córnea. A mucosa palatina pode também sofrer necrose e separar-se do bico. As lesões no bico são vistas mais frequentemente em aves do género *Cacatua* sp. e em catatuas de Galah (*Eolophus roseicapillus*) (Olsen, 2003). A cera pode também sofrer o mesmo tipo de lesões. Tal como a afecção da plumagem, as alterações do bico costumam ser simétricas (Gerlach, 1994).

Imagem 2 – Papagaio Cinzento apresentando alopecia e picacismo, devido a infecção crónica por BFDV, na totalidade das penas de cobertura, revestimento e vôo, à excepção da cabeça.



As aves afectadas frequentemente estão imunossuprimidas, devido à infecção da bolsa de Fabricius, baço, timo e medula óssea, e frequentemente morrem devido a infecções bacterianas, parasitárias, fúngicas ou virais secundárias, no período de um ano após o início das alterações na plumagem (Greenacre, 2005; Latimer et al., 1992; Ritchie, 1995). Phalen (2006) refere a infecção secundária por poliomavirus em papagaios ecléticos adultos como causa de morte.

A esperança de vida dos animais infectados pode, no entanto, prolongar-se acima dos 10-15 anos em quadros menos malignos e com assistência e maneio adequado (Greenacre, 2005; Ritchie, 1995).

1.7 Diagnóstico

Na presença de um quadro clínico compatível, o diagnóstico laboratorial é fundamental. Os meios de diagnóstico que se apresentarão podem também servir para diagnosticar quadros silenciosos e precoces ou monitorizar grupos de psitacídeos. Actualmente, a PBFD é diagnosticada através de histopatologia, PCR, HA e HI. O método de PCR é actualmente o mais frequentemente utilizado no diagnóstico *in vivo* nos países europeus, norte-americanos e na Oceânia (Bert et al. 2005; Khalesi, 2007; Phalen, 2006).

1.7.1 Histopatologia

A histopatologia é o meio de diagnóstico mais antigo de PBFD e pode ser aplicada a microscopia óptica e electrónica. As técnicas de microscopia têm como vantagem a possibilidade de se observar directamente o vírus na forma de corpos de inclusão intracitoplasmáticos de 15-20 nm nas células epiteliais e leucócitos da medula óssea, baço, timo, bolsa de Fabricius e dos folículos da pena. (McOrist, Black & Pass, 1984; Greenacre, 2005; Sanada, Sanada & Kubo, 1999).

Algumas lesões histopatológicas são também típicas de PBFD, nomeadamente ao nível dos órgãos linfóides onde se observa depleção linfocitária, edema, infiltração leucocitária, assim como os já referidos corpos de inclusão intracitoplasmáticos virais (Doneley, 2003).

A desvantagem das técnicas histopatológicas prende-se com o facto de serem necessárias amostras cuja recolha é obrigatoriamente invasiva ou apenas praticável no exame *post mortem*. Este facto torna-a pouco prática no diagnóstico de animais vivos, sendo, no entanto, extremamente útil na investigação de animais mortos.

Após o diagnóstico histopatológico podem ser aplicadas técnicas de PCR sobre as amostras fixadas para confirmar o diagnóstico (Gerlach, 1994).

1.7.2 Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação (HA e HI)

Tal como referido anteriormente, o circovirus aviário tem a capacidade de aglutinar os eritrócitos de determinadas espécies animais, quando é colocado em contacto com estes.

De entre os vírus que afectam aves, sabe-se que o vírus da Influenza aviária e os paramixovírus também têm esta capacidade (Phalen, 2006).

O diagnóstico do BFDV por hemaglutinação pode ser feito com eritrócitos de catatua-Goffin, catatua Galah ou de cobaio (*Cavia porcellus*), embora também tenha sido demonstrada com sangue de outros psitacídeos (Kondiah, Albertyn & Bragg, 2005).

As técnicas de hemaglutinação são muito sensíveis, mas podem ser pouco específicas pela presença de hemaglutininas ou inibidores da hemaglutinação no soro das aves (Phalen, 2006).

A inibição da hemaglutinação é avaliada quando se junta o vírus ou um antígeno viral com o soro diluído do animal em estudo. Colocando o soro em contacto com os eritrócitos, poderá obter-se um título de anticorpos do soro, pela neutralização dos vírus e ausência de hemaglutinação (Phalen, 2006; Khalesi, 2007). Esta técnica permite igualmente avaliar se a hemaglutinação se deveu de facto à presença do vírus na amostra ou ocorreu um falso positivo (Khalesi, 2007).

Coparativamente aos restantes métodos, tem como vantagem o facto de ser o mais económico e de dar resultados de HA e HI quantitativos, o que pode permitir ao clínico avaliar melhor o estado da infecção.

Um título de HA de penas superior a 640 HAU (unidades de hemaglutinação) por 50µl é diagnóstico de infecção crónica especialmente em catatuas (Khalesi et al., 2005).

A HI é o meio de eleição para detecção de anticorpos e estudos seroepidemiológicos. A HI no sangue está inversamente relacionado com o título de HA nas penas e, normalmente, também com a PCR de penas (Khalesi et al., 2005).

Um valor positivo de HI é um forte indicador negativo do estado de doença e poderá relacionar-se com a imunidade à mesma, pois são detectados títulos HI positivos em animais saudáveis e negativos nos testes antigénicos (Khalesi et al., 2005). No entanto, os

animais com infecção activa ou crónica poderem ter títulos baixos intermitentes (Khalesi et al., 2005). Estes factos realçam a importância na imunidade do hospedeiro no quadro patológico da PBFD.

A relação inversa (baixos títulos de anticorpos com testes de antígeno superiores) observa-se possivelmente devido à afecção do sistema imunitário causada pelo BFDV. Nestas situações vão provavelmente originar-se quadros clínicos de maior gravidade (Khalesi et al., 2005).

1.7.3 Polymerase chain reaction (PCR)

Este método é actualmente o mais utilizado para a detecção do antígeno viral que produz a PBFD. Consiste na ampliação de um segmento de DNA viral que permitirá detectar a presença do agente patogénico. As amostras a submeter para PCR podem ser de qualquer tecido animal ou mesmo de zangãos ambientais (Phalen, 2006).

Nos ensaios de PCR, o DNA é extraído de uma amostra biológica e posteriormente aquecido juntamente com uma DNApolimerase resistente à temperatura, um *primer* e um agente tampão. Os *primers* deverão ser seleccionados sabendo que estes se podem conjugar a uma determinada distância das extremidades do DNA viral. Se o agente viral estiver presente, o aquecimento e arrefecimento repetido do fragmento de DNA permite a amplificação até uma concentração detectável através de várias técnicas (Phalen, 2006).

A análise de PCR é regularmente efectuada sobre o gene ORF V1, localizado na cadeia de DNA no sentido paralelo. Este gene codifica uma proteína associada à replicação vírica (Ypelaar, Bassami, Wilcox, & Raidal, 1999). O PCR com *primers* deste gene originou resultados mais consistentes que para ORF C1 (gene codificante de uma proteína da cápside), visto ser altamente conservado, ainda que não universalmente. De facto, foram observadas variações no gene ORF V1, mas estas são suficientemente pequenas para não provocarem falsos negativos na generalidade dos testes (Hess et al. 2004; Ritchie et al. 2003b). A análise de PCR demonstrou ser mais sensível e específica que a HA na detecção de antígeno (Khalesi et al., 2005).

A análise genética pode ser realizada sobre qualquer tecido da ave, não havendo ainda dados conclusivos quanto ao(s) tecido(s) de eleição. Como exemplo, num estudo com inseparáveis (*Agapornis* sp.), nenhuma ave resultou positiva no PCR de penas, sem que o vírus ocorresse no sangue (Khalesi et al., 2005).

Nos periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), pelo contrário, o PCR de penas e de zangão cloacal mostrou-se mais sensível que o de sangue (Hess et al., 2004). Neste último estudo, por outro lado, nem todos os animais com detecção de DNA viral nas penas e

cloaca demonstraram sinais clínicos, estando a detecção do vírus no sangue mais correlacionada com o estado de doença.

A análise de PCR sanguíneo pode dar origem a falsos negativos nas seguintes situações: amostras em tubos heparinizados; devido ao excesso de material biológico que pode gerar interferência (neste caso a amostra pode ser purificada através de filtração); a erros de procedimento na colheita e no processamento; à degradação das amostras no transporte ou mesmo devido ao número de leucócitos ser tão reduzido que não se detectem células portadoras de DNA viral (Khalesi, 2007; Olsen & Speer, 2009).

Os falsos positivos podem surgir devido à presença de material genético viral num animal que tenha eliminado a infecção anteriormente – os viriões inactivados podem persistir até 3 meses no corpo da ave. Assim, numa ave positiva, a análise deverá ser repetida pelo menos três meses após a remissão dos sintomas. Podem também ocorrer falsos positivos na análise de PCR por contaminação cruzada no momento da colheita ou no laboratório (Khalesi et al., 2005).

Recentemente, Olsen e Speer (2009), estudaram cinco laboratórios e obtiveram valores totais de sensibilidade e especificidade de 98% e 82%, respectivamente. Neste estudo, pôde-se avaliar a discrepância entre os resultados obtidos nos diferentes laboratórios testados. De facto, a maioria dos laboratórios conseguiu resultados muito satisfatórios mas os erros ocorreram com demasiada frequência noutros.

O desenvolvimento de novas técnicas baseadas no PCR tem-se observado nos últimos anos e a sua aplicação prática no diagnóstico da PBFD poderá ser muito útil. O RT-PCR (*Real Time PCR*), por exemplo, permite quantificar a quantidade de viriões e, assim, caracterizar melhor a infecção e avaliar o tratamento. Esta técnica apresenta níveis de sensibilidade comparáveis ao PCR convencional (Katoh, Ohya & Fukushima, 2008).

1.7.4 Discussão

A ausência de *kits* de diagnóstico com certificação oficial pode limitar a confiança depositada nos vários métodos laboratoriais e obriga o laboratório que processa a análise a assumir a responsabilidade do método utilizado. O clínico, por sua vez, deverá certificar-se que a recolha e envio das amostras é feita de forma correcta e que não há lugar a erros que possam alterar os resultados (Olsen & Speer, 2009).

Foi descrito o desenvolvimento de um teste de ELISA directo para detecção de anticorpos anti-BFDV que terá que ser validado com uma amostra de maiores dimensões (Khalesi et al., 2005). O antígeno foi obtido através da produção de uma proteína da cápside recombinante expressada em *E. coli* (Johne, Raue, Grund, Kaleta & Muller, 2004). Esta técnica de diagnóstico poderá ter utilidade num futuro mais ou menos próximo.

A interpretação dos resultados laboratoriais deve ter sempre em conta a história e exame clínico do paciente. Num animal jovem ou de uma espécie susceptível e com um quadro clínico compatível, deverá igualmente ser feita uma prova laboratorial para detecção do Polyomavirus aviário (APV), pois o quadro clínico pode ser indistinguível (Phalen, 2006).

A HA e HI têm a vantagem de nos dar um resultado quantitativo, mas podem ser menos fiáveis (em termos de sensibilidade e especificidade) que um PCR não-quantitativo que, por outro lado, apenas nos indica a presença do DNA viral. A combinação de várias provas laboratoriais é recomendada como melhor forma de diagnóstico, podendo a HA e a HI ser úteis para monitorizar um animal doente (Khalesi et al., 2005).

O PCR de amostras de sangue pode não ser a melhor análise para exames de monitorização e rotina. Esta prova pode dar origem a falsos negativos e não detectar alguns animais portadores assintomáticos, que não sejam virémicos. Nestes casos, poderá ser mais indicado realizar análise genética de amostras conjuntas dos vários tecidos (sangue, penas e zaragatoa cloacal).

A Medula Óssea, Bolsa de Fabricius, baço, timo ou fígado poderão ser tecidos onde a aplicação da testagem de PCR é mais sensível, em certas fases da doença, devido à maior concentração nas células destes órgãos. A sua aplicação tem a limitação de necessitar de técnicas muito invasivas ou apenas indicadas em exames pós-morte.

O diagnóstico por histopatologia, tal como referido anteriormente, tem especial interesse nos animais mortos. Quando ocorre um quadro de sintomatologia aguda que provoque a morte da ave, a análise histopatológica dos tecidos recolhidos na necrópsia é fundamental para se poder diagnosticar correctamente a infecção por BFDV.

1.8 Tratamento e profilaxia

Não existe tratamento específico e com eficácia inquestionável para a PBFD. O tratamento sintomático e de suporte são as únicas formas de controlar a doença e com uma taxa de sucesso reduzida, especialmente nos quadros mais agudos. A profilaxia envolve o controlo analítico e a quarentena dos animais recém-adquiridos, o isolamento e/ou a eutanásia dos animais positivos, assim como a limpeza, desinfecção e vazio sanitário prolongado das instalações onde permaneceram indivíduos infectados.

A testagem preventiva de animais tem sido utilizada como forma de prevenir a disseminação da doença e de reduzir a prevalência da infecção.

A aplicação deste tipo de medidas de controlo tem tido resultados favoráveis com vista ao controlo e redução do número de indivíduos positivos na população aviária (Bert et al., 2005; Dahlhausen & Radabaugh, 1997). Nos EUA, numa campanha de controlo de cinco anos

baseada na detecção dos animais positivos e subsequente eliminação/isolamento, pôde reduzir-se a prevalência de animais positivos de 5% para 3,5% (Bert et al., 2005).

Com o objectivo de encontrar um tratamento para a PBFD, um estudo demonstrou alguma eficácia na utilização de interferon omega felino tipo 1 (Virbagen omega®, Virbac Animal Health, França) em conjunto com nebulizações com um desinfectante viricida à base de amónia quaternária (F10 SC®, Health and Hygiene Ltd, África do Sul). Este tratamento é bastante dispendioso e apresenta uma taxa de sucesso relativamente reduzida. Foram de qualquer forma registados resultados satisfatórios ao nível da prevenção da infecção de aves negativas que contactaram com o vírus (Stanford, 2004).

Recentemente, um outro trabalho teve resultados animadores utilizando beta-(1,3/1,6)-D-glucano na eliminação da infecção por BFDV em periquitos do género *Eunymphicus* sp. e catatuas de Mitchell (*Cacatua leadbeteri*) (Tomasek & Tukac, 2007). Este princípio activo encontrado em cogumelos parece apresentar propriedades moduladoras do sistema imunitário, estimulando-o a adquirir imunidade contra esta infecção viral.

É necessário, nos animais positivos, controlar as infecções secundárias dos folículos e do bico, assim como a possibilidade de infecções sistémicas secundárias à imunossupressão. Destas últimas, destacam-se a aspergilose e criptosporidiose pela sua gravidade e difícil tratamento (Gerlach, 1994). Nos quadros agudos, as infecções bacterianas e septicémia deverão ser controladas utilizando antibióticos de largo-espectro e fluidos por via parentérica. A alimentação forçada poderá estar indicada e as condições de temperatura e humidade deverão também ser as mais indicadas, tendo em conta a ave em questão e o seu estado físico (Phalen, 2006; Schoemaker et al., 2000).

Os circovirus são muito estáveis no ambiente e resistentes a muitos tratamentos físicos. O PCV 1 e CAV mostraram ser resistentes a formol e éter e a 15 minutos à temperatura de 70°C e pH 3. O tratamento com iodo ou lixívia a altas concentrações foi capaz de inactivar o BFDV num estudo (Khalesi, 2007). Segundo Greenacre (2005), o agente pode ser inactivado com a aplicação de Iodo a 1%, hipoclorito de sódio, B-propionolactona a 0,4%, glutaraldeído a 1% e com calor (80°C durante 1 hora).

Bonne, et al. (2009) publicaram resultados satisfatórios na produção de uma vacina recombinante a partir da proteína da cápside do BFDV (recBFDVcap), que poderá vir a ser desenvolvida comercialmente no futuro. A produção desta proteína recombinante poderá igualmente facilitar o desenvolvimento de testes de diagnóstico de ELISA mais eficazes (Stewart, et al. 2007).

2. Material e métodos

Para a realização deste estudo foram compilados os resultados individuais da detecção do BFDV por PCR de 1348 psitacídeos de cerca de 83 espécies diferentes (não foi possível identificar a espécie de 15 animais).

As amostras foram recolhidas entre Dezembro de 2005 e Maio de 2008 na grande maioria pela equipa do Hospital Zoològic Badalona (n=1269). Foram igualmente contabilizadas os resultados de animais provenientes de outras localizações em Espanha (n=82).

A testagem por PCR foi realizada no laboratório Applus + - Análisis Genéticos de Bellaterra, Barcelona, pela ampliação do gene ORF-V1, com base na técnica descrita por Ypelaar et al. (1999).

Foram analisados animais de todas as idades, saudáveis e doentes, indiscriminadamente. O propósito das recolhas foi o controlo de animais aparentemente saudáveis (recentemente adquiridos, em quarentena, para emissão de certificados com fins comerciais ou por vontade dos proprietários), e no processo de diagnóstico clínico, quando houve suspeita de infecção por BFDV, e sempre que os proprietários estivessem de acordo.

Praticamente todas as aves estudadas são nascidas em cativeiro em países europeus e a maioria foi testada em idade jovem e com fins comerciais.

As amostras analisadas foram de sangue em 99,8% dos casos (n=1345), tendo sido realizado o ensaio PCR em amostras de fígado, baço e bolsa de Fabricius nas restantes ocasiões (n=3).

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular direita e recolheu-se, consoante a espécie, idade, tamanho e estado físico do animal, entre 0,1 e 2 ml de volume. Alternativamente, nalguns casos, por questões técnicas, optou-se pela punção da veia cubital para a recolha de sangue. Previamente à recolha, o local de punção foi sistematicamente desinfectado com álcool etílico a 70% (v/v) e procedeu-se ao afastamento e/ou remoção das penas para visualização da veia em questão.

O sangue foi armazenado em EDTA e mantido refrigerado entre 2 e 8 °C, quando necessário, e por um período de tempo mínimo necessário para o transporte para o laboratório onde foi processado.

Em paralelo foram realizadas sexagens (nas espécies sem dimorfismo sexual) e testes para a presença de *Chlamydophila psittaci* numa grande proporção das amostras sanguíneas – 77,7% (n=1048) dos animais foram sexados e em 91,2 % (n=1230) foi pesquisada a presença daquele microrganismo.

Para os testes acima referidos foi aplicada a técnica de PCR realizada no mesmo laboratório. A sexagem foi efectuada através da ampliação do gene CHD1 com base na técnica descrita por Griffiths, Double, Orr e Dawson (1998). Por sua vez, a presença da bactéria *Chlamydophila psittaci* foi detectada através da ampliação por PCR do gene MOMP presente no genoma deste microrganismo, com base na técnica descrita por Kaltenboeck, Kousoulas e Storz (1991).

A análise estatística dos dados obtidos, executada com o software SPSS® v.17, utilizou métodos descritivos e o teste de qui-quadrado, para a comparação de diferença de prevalências entre espécies do Novo Mundo e do Velho Mundo.

Onde aplicável, as médias foram apresentadas em conjunto com o respectivo desvio padrão (média \pm desvio padrão). Para as estimativas de prevalência foram calculados os intervalos de confiança de 95%. O programa Win Episcope Version: 2.0, foi utilizado para averiguar a representatividade da amostra.

3. Resultados e discussão

Estima-se que a amostra estudada seja representativa da população da Península Ibérica para uma prevalência esperada de 3% e nível de confiança de 1% - admitindo uma população ibérica total de 10.000.000 de aves psitacídeas e com base nos cálculos efectuados com o programa Win Episcopo 2.

No caso dos subgrupos taxonómicos *Agapornis* sp., *Aratinga* sp., *Poicephalus* sp. e *Nymphicus hollandicus*, o nível de confiança é de apenas 10%. Nos restantes, devido ao maior tamanho da amostra, o nível de confiança é de 5%. Os grupos taxonómicos dos Pionites e Lorídeos não são representativos da população por terem um pequeno número de casos observados.

Foram encontrados animais positivos de nove espécies diferentes de psitacídeos. Na sua maioria de espécies Africanas, Asiáticas e do Pacífico (n=29) e em menor número de psitacídeos do Novo Mundo (n=6).

Entre todos os animais observados, a prevalência de positivos foi de 2,60% ($\pm 0,8\%$). O valor relativo deste parâmetro foi mais elevado para os psitacídeos do Velho Mundo (3,39%), relativamente às espécies americanas (1,22%) (Ver tabela 5).

Tabela 5 – Resultados de PCR de BFDV agrupados por região de origem da espécie, com estimativas da respectiva prevalência e intervalos de confiança (I. C.) de 95%.

Grupo	Nº de Positivos	Total de animais	Prevalência (%)	Prevalência I.C. de 95%
Espécies Novo Mundo	6	492	1,22	[0,25 % – 2,19 %]
Espécies Velho Mundo	29	856	3,39	[2,18 % – 4,60 %]
Total	35	1348	2,60	[1,75 % – 3,45%]

Para o nível de significância de 5%, com base nos resultados do teste de χ^2 ($p=0,029$), os dados evidenciam uma diferença significativa entre as prevalências dos psitacídeos do Velho Mundo e dos psitacídeos do Novo Mundo, o que está em conformidade com as teses até agora publicadas (Gerlach, 1994; Bert et al., 2005).

A espécie que apresentou maior prevalência no presente estudo foi o papagaio eclético (*Ecletus roratus*) com 8% de positivos, seguido do grupo dos animais do género *Agapornis* sp., com 6,67%. Devido às dimensões relativamente reduzidas das amostras destes grupos taxonómicos, os intervalos de confiança das prevalências não se podem comparar estatisticamente com os valores obtidos nos outros grupos (ver tabela 6).

Na análise das prevalências relativas, destacou-se o valor obtido no grupo taxonómico das araras (*Ara* sp.) por ter sido o mais elevado entre as espécies americanas e por ter superado a prevalência dos papagaios cinzentos africanos (*Psittacus erithacus*).

Tabela 6 – Resultados da prevalência de BFDV pelo método de PCR, tendo em conta os grupos taxonómicos considerados

Grupo Taxonómico	Total positivos Pbfd	Total de animais (n)	Prevalência (%)
<i>Psittacidae</i>	33	1228	2,69
○ <i>Ecletus roratus</i> ssp.	8	100	8
○ <i>Agapornis</i> sp.	2	30	6,67
○ <i>Ara</i> sp.	4	120	3,33
○ <i>Psittacus erithacus</i>	16	554	2,89
○ <i>Poicephalus</i> sp.	1	49	2,04
○ <i>Amazona</i> sp.	2	298	0,67
○ <i>Aratinga</i> sp.	0	34	0
○ <i>Pionites</i> sp.	0	13	0
○ Outros	0	30	0
<i>Loriidae</i>	0	10	0,00
<i>Cacatuidae</i>	2	110	1,82
○ <i>Cacatua e Eolophus</i> sp.	2	91	2,20
○ <i>Nymphicus hollandicus</i>	0	19	0,00
Total Geral	35	1348	2,60

Tal como veremos adiante, nenhuma arara apresentou sintomas consistentes com PBFD, ao contrário dos papagaios cinzentos que frequentemente demonstraram sintomas da infecção viral. Diversos autores têm descrito a menor predisposição das espécies americanas para um quadro sintomático (Gerlach, 1994).

Na tabela 7 são apresentados os resultados agrupados em função das espécies onde foram registados animais positivos. Nesta tabela destaca-se a ocorrência de resultados de PCR de sangue positivos em aves das espécies *Amazona albifrons* e *Agapornis cana*, espécies onde a ocorrência da infecção não havia ainda sido publicada.

Tabela 7 – Resumo estatístico das espécies em que se observou infecção por BFDV

Espécie	Testados (nº)	Positivos (nº)	Assintomáticos (nº)	Infecção Crónica (nº)	Infecção Aguda (nº)	n/a* (nº)
<i>Psittacus erithacus</i>	557	16	5	2	4	5
<i>Ecletus roratus</i>	96	8	4	1	1	2
<i>Ara ararauna</i>	70	4	4			
<i>Amazona aestiva</i>	44	1				1
<i>Cacatua alba</i>	43	1		1		
<i>Poicephalus senegalensis</i>	38	1				1
<i>Cacatua galerita triton</i>	9	1	1			
<i>Agapornis cana</i>	4	2	2			
<i>Amazona albifrons</i>	2	1	1			
Total	863	35	17	4	5	9

* n/a – não classificado

Entre os animais positivos foi possível avaliar o quadro clínico em 26 animais.

O quadro agudo foi observado principalmente em papagaios cinzentos africanos (25% dos animais positivos desta espécie), mas também em *Ecletus roratus* ssp. (n=1).

A forma crónica foi por sua vez observada em catatuas brancas, para além dos papagaios cinzentos e dos papagaios ecléticos.

O quadro clínico mais frequentemente identificado foi o assintomático (n=17, 49% do total de positivos). Este facto é relevante em termos de patogenia do vírus e reforça a importância da testagem rotineira dos animais, mesmo que aparentemente saudáveis. Os animais positivos assintomáticos apresentam quadros latentes em que potencialmente poderão transmitir a infecção e/ou vir a desenvolver sintomas posteriormente. Tal como referido anteriormente nesta dissertação, o período de incubação pode chegar a ser muito prolongado, pelo que a última hipótese tem forçosamente que ser tida em conta.

Na Tabela 8, estão descritos os quadros observados nos animais positivos, juntamente com os sintomas e os resultados de algumas análises laboratoriais efectuadas paralelamente nos mesmos (sexagem, detecção de *Chlamydophila* sp. por PCR, hematologia e dados de necrópsia). Nos restantes animais com ensaios positivos (n=9) não foi possível avaliar o quadro clínico, mas são apresentados os dados disponíveis sobre os mesmos.

Os animais onde se detectou a presença do BFDV foram na grande maioria jovens com menos de 3 anos (92,3%, n=26) e a PBFD foi registada em apenas dois animais que tinham atingido a maturidade. Estas duas aves adultas eram papagaios cinzentos africanos e apresentavam o quadro crónico.

As amostras *post-mortem* de outros tecidos que não sangue resultaram sempre positivas (n=3), o que pode revelar maior sensibilidade da análise de PCR para o tecido de órgãos linfóides e hepático. Como já foi referido anteriormente, o BFDV infecta células em multiplicação e leucócitos e estes tendem a concentrar-se nos órgãos com funções imunitárias da ave. É também necessário ter em conta que a testagem destes tecidos apenas foi efectuada quando havia forte suspeita da doença, ao contrário das recolhas de sangue que são efectuadas a um leque muito mais alargado de aves.

Deve-se realçar o facto de que nem todos os animais que se foram apresentando neste período de tempo com um quadro de doença multissistémica infecciosa, compatível com a apresentação aguda da doença, foram testados laboratorialmente para a presença do DNA do BFDV por PCR ou outro método.

Para a análise dos dados, teremos que ter em conta que nem todos os proprietários se mostraram disponíveis para efectuar a testagem de PCR quando os seus animais se apresentaram com problemas de plumagem e com suspeita de infecção crónica por BFDV.

Tendo em conta estes dois factos podemos admitir que a prevalência total pode pecar por defeito.

O valor de prevalência de 2,60% foi o valor mais reduzido entre os estudos efectuados no Continente Europeu.

A diminuição da prevalência não pôde ser comparado com o valor encontrado por Rahaus & Wolff (2003) pois, nesse estudo, o PCR foi efectuado sobre tecidos diferentes e baseou-se numa amostra de apenas 146 animais.

A comparação com o estudo publicado por Bert et al. (2005) terá maior sustentação pois foram analisadas amostra de sangue tanto de animais assintomáticos como doentes e numa amostra muito maior. A região geográfica analisada por Bert et al. (2009) foi a Itália.

A diferença no valor de prevalência apurado entre os dois estudos pode-se explicar por:

- Em Itália ocorre mais frequentemente o BFDV;
- Durante o período de tempo 2005-2008, a aplicação de métodos de diagnóstico e o isolamento, tratamento e eliminação dos animais positivos permitiu que a doença ocorresse menos frequentemente na Catalunha (Dahlhausen & Radabaugh, 1997);
- No presente estudo houve um maior número de falsos negativos devido a erros na colheita, transporte e processamento das amostras;
- Houve um número de animais com morte súbita e quadro agudo onde não se efectuou o PCR e que seriam positivos relativamente Maiores no presente estudo.

Nenhum dos inseparáveis (*Agapornis* sp.) positivos (n=2) apresentava sintomas. A observação de campo sugeriu uma prevalência mais elevada dentro deste género. Foram excluídas deste estudo todas as análises que incluíssem o sangue de mais de um animal misturado (por jaula, secção, etc). Estas não se enquadravam na restante análise estatística, que apenas contabiliza exames individuais. Devido às limitações de custos, foi frequente optar-se pela testagem de vários indivíduos simultaneamente, quando se tratava de exemplares com menor valor comercial. Desta forma, uma quantidade relevante de resultados positivos foi excluída do presente estudo.

A elevada prevalência de portadores assintomáticos de *Agapornis* sp. (6,67%) veio corroborar teses já publicadas em que é conhecida a predisposição das aves deste género para quadros silenciosos de PBFD (Phalen, 2006).

Nenhuma das crias examinadas rotineiramente com fins comerciais apresentava sintomas no momento do exame físico e da recolha de sangue para análise, mesmo que resultassem positivas. Estas aves juvenis foram testadas preventivamente e são normalmente trazidas directamente pelos criadores ou chegam através de intermediários a caminho do local de venda e/ou futuros donos.

A ausência de sintomas nas crias PCR-positivas pode ser explicada pelas seguintes hipóteses: Estes animais possuem imunidade ao Circovirus e são animais com infecção transitória; Estes animais foram infectados recentemente (no transporte ou centro de cria) e encontram-se no período de virémia - posteriormente poderiam evoluir para um quadro

agudo, crónico ou latente; por último, podem representar falsos positivos por contaminação laboratorial ou no momento da recolha.

Como seria de esperar, verificou-se que os resultados de PCR de BFDV são completamente independentes dos testes para a presença de *Chlamydomphila* sp., visto não se ter observado a infecção associada dos dois agentes em nenhum caso.

A infecção foi diagnosticada em 4 machos e 3 fêmeas sexados. Não foi encontrada qualquer relação entre a infecção pelo BFDV e o sexo, através da testagem pelo método de X^2 ($p>0,05$).

Entre os sintomas observados destaca-se a deficiente plumagem, presente em 37,5% dos casos sintomáticos. Nos animais onde se classificou o tipo de infecção como crónico, 75% apresentavam lesões de plumagem mais ou menos extensas.

Observou-se anemia em 83% dos animais em que foi efectuada hematologia ($n=6$). Observou-se leucopenia numa proporção semelhante (83%, $n=6$). Não foi observada leucocitose em nenhum animal positivo. A média da contagem de leucócitos é de $4,2 \pm 4,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ – o intervalo de referência nas espécies estudadas tem o limite mínimo de $5,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (ver Anexo 2). A severidade destas duas alterações hematológicas deverá estar relacionada com o prognóstico do quadro clínico. Todos os animais com contagens de leucócitos mais baixas (perto de 1000 leucócitos/ μl) desenvolveram o quadro agudo que lhes foi fatal.

Não se observou qualquer relação com os parâmetros bioquímicos hepáticos e renais. Nos animais onde tal foi estudado ($n=4$), não se verificou aumento da Aspartato amino transferase (AST) e do Ácido úrico sérico (AU). Efectivamente, a hepatite pode fazer parte do quadro clínico da PBFD aguda/subaguda mas neste estudo não foi observada correlação com os parâmetros indicativos de lesão hepática (Ritchie, 1995; Doneley, 2003).

Num *Ecletus roratus* onde não foram efectuadas provas bioquímicas *ante-mortem* e que faleceu subitamente na necrópsia foram encontradas alterações hepáticas macro e microscópicas. O fígado apresentava-se pálido no exame *post-mortem* e no estudo histopatológico detectaram-se focos de necrose, infiltração leucocitária (linfócitos, eosinófilos

Tabela 8 – Dados clínicos registados dos animais positivos

Espécie	Idade	Sexo	Amostra	PCR <i>Chlamy- dophila</i>	Quadro clínico (classificação)	Sintomas	Hema- tócrito (%) ¹	Leucócitos totais (x10 ³) ¹	Asper- gilose	Óbito
<i>Amazona aestiva</i>		Macho	Sangue	Negativo	Não reportado					
<i>Ecletus roratus</i>			Sangue		Não reportado					
<i>Ecletus roratus</i>			Sangue		Não reportado					
<i>Poicephalus senegalus</i>		Fêmea	Sangue	Negativo	Não reportado					
<i>Psittacus erithacus</i>			Sangue		Não reportado					
<i>Psittacus erithacus</i>			Sangue		Não reportado					
<i>Psittacus erithacus</i>			Sangue	Negativo	Não reportado					
<i>Psittacus erithacus</i>			Sangue	Negativo	Não reportado					
<i>Psittacus erithacus</i>		Fêmea	Sangue	Negativo	Não reportado					
<i>Agapornis cana</i>	Jovem adulto		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Agapornis cana</i>	Jovem adulto		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Psittacus erithacus</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Psittacus erithacus</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ara ararauna</i>	Cría semi- emplumada	Fêmea	Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ecletus roratus</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ecletus roratus</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Psittacus erithacus</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ecletus roratus</i>	Adulto		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ecletus roratus</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ara ararauna</i>	Cría semi- emplumada	Macho	Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Cacatua galerita triton</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Psittacus erithacus</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Amazona albifrons</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Psittacus erithacus</i>	Cría semi- emplumada		Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ara ararauna</i>	Cría semi- emplumada		Sangue		Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ara ararauna</i>	Cría semi- emplumada	Macho	Sangue	Negativo	Assintomático	Não identificados	?	?	?	?
<i>Ecletus roratus</i>	3 anos		Sangue	Negativo	Crônico	Totalmente deplumado à excepção da cabeça, leve automutilação na zona da cauda.	?	?	?	Não
<i>Psittacus erithacus</i>	23 anos		Sangue	Negativo	Crônico	Picacismo antigo, automutilação localizada com ferida que não cicatrizava, sinusite crônica.	35	6	?	Sim
<i>Psittacus erithacus</i>	12 anos		Sangue	Negativo	Crônico	Picacismo antigo praticamente totalidade do corpo.	47	2,8	?	-
<i>Cacatua alba</i>	9 meses		Sangue	Negativo	Crônico	Anorexia, magreza	36	12,8	Não	?
<i>Ecletus roratus</i>	5 meses	Macho	Baço	Negativo	Agudo	Morte súbita	?	?	Sim	Sim
<i>Psittacus erithacus</i>	60d		Bolsa de fabrius	Negativo	Agudo	Morte súbita, anorexia.	?	?	Sim	Sim
<i>Psittacus erithacus</i>	120d		Sangue	Negativo	Agudo	Perda de peso, contacto com animal positivo.	42	0,8	?	Sim
<i>Psittacus erithacus</i>	10 meses		Fígado	Negativo	Agudo	Anorexia, apatia, mucosas pálidas, urina amarela, paresia das extremidades.	16	<1	Não	Sim
<i>Psittacus erithacus</i>	1 ano		Sangue	Negativo	Agudo	Anorexia	16	1,8	?	Sim

¹No Anexo 2 estão apresentados os valores de referência hematológicos de algumas espécies de psitacídeos.

e heterófilos) e a presença de vacúolos dentro do citoplasma dos hepatócitos. No mesmo animal, observaram-se também lesões macroscópicas noutros órgãos: petéquias musculares, presença de líquido seroso no pericárdico e cavidade celómica, atrofia e palidez do baço, pneumonia e aerossaculite por *Aspergillus* sp.. A histopatologia revelou, além das lesões hepáticas acima referidas, depleção leucocitária no baço e bolsa de Fabricius. Nos leucócitos presentes neste último órgão detectaram-se os corpos de inclusão intracitoplasmáticos característicos do BFDV.

A infecção com quadro clínico agudo foi fatal em todos os casos observados e afectou principalmente papagaios cinzentos africanos (n=5), assim como o papagaio eclético acima referido. Nestes casos, a imunossupressão e as infecções secundárias oportunistas provocaram o desfecho letal dos casos observados.

Nos animais deste estudo onde foi possível seguir o quadro clínico, não se detectaram sintomas em nenhuma ave originária do Continente Americano. Apesar de actualmente se saber que a PBFD pode demonstrar sintomas nos psitacídeos do Novo Mundo (Phalen, 2006), alguns autores acreditavam que tal não deveria ocorrer (Gerlach, 1994). No entanto, a infecção destes animais é muito importante pois potencialmente podem transmitir a doença a indivíduos susceptíveis.

4. Conclusões

A prevalência observada no presente estudo é menor que a relatada na maioria dos estudos anteriores, particularmente daqueles realizados em países europeus (Bert et al., 2005; Hsu et al. 2006; Khalesi et al., 2005; Phalen, 2006; Rahaus & Wolff, 2003; Raidal et al., 1993; Ritchie, 1995).

Este facto pode significar que a doença está mais controlada nesta região da Península Ibérica do que noutras regiões geográficas. Pode também significar que o controlo sistemático do estado dos animais comercializados através do PCR sanguíneo, tal como vem sendo realizado, é uma importante arma face a esta doença infecciosa, sem tratamento eficaz conhecido.

Observou-se a infecção em *Amazona albifrons* e *Agapornis cana*, espécies onde não havia ainda sido documentada. Pelo facto de ser bem conhecida a pouca especificidade para hospedeiros dentro da Família *Psittacidae*, não foi dado maior destaque a esta observação. De todas as formas, deverá registar-se este facto para situações futuras.

A ocorrência de uma elevada percentagem de positivos assintomáticos encontra-se de acordo com teses já publicadas e torna-se importante pois sabemos tratar-se de possíveis fontes de contágio e dispersão do vírus (Ritchie, 1995; Dahlhausen & Radabaugh, 1997).

A infecção de animais saudáveis devido ao contacto com portadores assintomáticos foi já descrita e conhece-se a capacidade de determinados grupos taxonómicos manterem infecções latentes (Phalen, 2006). Através da realização de testes de diagnóstico preventivos, a detecção dos animais portadores do BFDV permite-nos isolá-los dos saudáveis e impedir o seu contágio.

Tal como referido no capítulo 1.7, é questionável o facto de a grande maioria das análises de PCR terem sido efectuadas com sangue (99,8%) e disso resultar uma maior possibilidade de obter falsos negativos.

De forma a aumentar a sensibilidade da testagem efectuada, o controlo laboratorial sistemático deverá consistir na recolha de penas e de zaragatoa cloacal, juntamente com a amostra de sangue completo, visto a análise conjunta das amostras biológicas poder ser mais sensível (Khalesi et al. 2005; Hess et al., 2004).

O local de nascimento dos animais não foi tido em conta para a sua identificação, mas a grande maioria são nascidos em cativeiro em centros de cria de Espanha, Portugal, Europa Central e Itália. De facto, dos animais avaliados, uma grande percentagem foram crias acabadas de chegar de importações e que seriam posteriormente comercializadas. Neste contexto, não foi possível relacionar a infecção pelo BFDV com a origem geográfica dos animais. Suspeita-se no entanto que o circovírus aviário seja mais prevalente em determinadas regiões europeias que noutras.

Sugere-se o estudo mais aprofundado destas diferenças tendo em conta as rotas mais comuns de tráfico ilegal de animais selvagens e as vias de comercialização dos animais nascidos em cativeiro.

A PBFd não deve ser considerada apenas como uma doença de psitacídeos em geral e deverá ter-se em conta a espécie, a idade e a origem da ave em questão no diagnóstico desta doença (Phalen, 2006).

Os Papagaios cinzentos africanos mostraram estar muito predispostos à apresentação da sintomatologia aguda e o desfecho desta foi sempre fatal, o que é bastante coerente com os trabalhos já publicados (Schoemaker et al., 2000). Por outro lado, os animais do género *Ecletus* sp. mostraram estar mais predispostos a apresentar resultados positivos, embora seja mais raro o quadro agudo fatal (Phalen, 2006)

Tal como relatado em vários estudos anteriores, as aves do Novo Mundo apresentaram menor prevalência na infecção por esta doença viral na região em estudo (Phalen, 2006). Também foi mais rara a apresentação da sintomatologia clínica nas aves de espécies americanas, pelo que deverá alertar-se para uma eventual predisposição destas aves para os quadros assintomáticos e potencial transmissão a outros animais.

A hematologia mostrou ser útil para a avaliação do estado da infecção e na determinação de um prognóstico, pois nos quadros mais graves as alterações foram muito frequentes. Pela sua utilidade na avaliação geral do estado de saúde da ave em conjunto com o potencial valor prognóstico nos quadros de PBFd, é recomendada a realização destas provas na consulta de rotina das aves psitacíformes.

Tal como referido por Bert et al. (2005) a aplicação de métodos de diagnóstico de forma sistemática, especialmente ao nível dos centros de cria e dos circuitos comerciais é uma forma de combater e reduzir a prevalência da PBFd. O isolamento e/ou eliminação dos animais positivos, junto com as medidas de quarentena mínimas, permitiu um decréscimo da prevalência nos EUA e poderá estar a ter os mesmos resultados na região geográfica estudada.

A revisão bibliográfica da presente dissertação, assim como a análise dos casos clínicos observados, revelou as limitações actualmente existentes no tratamento de PBFd, tanto na forma aguda como crónica. É necessária a procura de novas formas de controlo dos sintomas e das complicações associadas a esta doença viral. O trabalho publicado por Tomasek e Tukac (2007) trouxe algumas esperanças e baseia-se na modelação e estimulação do sistema imunitário da ave.

A utilização das técnicas de hemaglutinação têm limitações mas poderão ser muito úteis na gestão de pacientes infectados e onde se queira avaliar a evolução da doença e a eficácia dos tratamentos. A utilização simultânea da hemaglutinação com o PCR de vários tecidos poderá ser uma forma de obter resultados mais fidedignos no diagnóstico da PBFd, embora

frequentemente seja difícil justificar os custos das análises simultâneas (Khalesi et al., 2005).

O desenvolvimento dos testes de ELISA poderá facilitar a detecção dos animais infectados, por se tratar de uma metodologia que poderá competir com o PCR no diagnóstico o mais sensível e específico de animais infectados (Khalesi et al., 2005).

A utilização simultânea de diferentes métodos de diagnóstico permite obter maior sensibilidade e, ao mesmo tempo, permite classificar mais correctamente o quadro infeccioso (Khalesi et al., 2005).

A quarentena de animais recém-adquiridos não deverá ser nunca menosprezada pela possibilidade de ocorrência de falsos negativos laboratoriais e de quadros silenciosos em animais não testados. A possibilidade de erros que provoquem falsos negativos foi sendo discutida ao longo desta dissertação e através da quarentena poderão ser minimizados os efeitos da sua ocorrência (Olsen & Speer, 2009).

A vacinação individual dos animais poderá ser a arma de eleição num futuro mais ou menos próximo, no controlo da BFDV. A vacina poderá ser produzida através da proteína recombinante recBFDVcap (Bonne et al., 2009) e são necessários estudos mais alargados que permitam confirmar a eficácia e segurança da vacina.

Até ao momento não foram designadas espécies reservatório do vírus. A existência de vários genótipos que não estão totalmente caracterizados em termos de patogenia e especificidade com hospedeiro vem dificultar o controlo da PBFD. No entanto, sabe-se que a prevalência e sintomatologia em diferentes espécies apresentam algumas características próprias. Desta forma, o contacto e a proximidade entre animais de espécies e origens distintas, deverá ser sempre evitado. Deverá ter-se especial atenção quando se tratar de espécies em que se tenham observado maiores diferenças em termos de patogenia e epidemiologia da PBFD.

Enquanto a imunização vacinal não está acessível e disponível comercialmente, a realização de testes de diagnóstico preventivos tal como tem sido feita, parece ser a melhor forma de se poder controlar a dispersão da doença.

5. Bibliografia

Albertyn, J., K. M. Tajbhai e R.R. Bragg (2004). Psittacine beak and feather disease virus in budgerigars and ring-neck parakeets in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 71, 29-34.

Bassami, L. R., D. Berryman, G. E. Wilcox e S. R. Raidal (1998). Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circovirus, and chicken anemia virus. *Virology*, 249, n.º 2, 453-459.

Bert, E., L. Tomassone, C. Peccati, M. G. Navarrete e S. C. Sola (2005). Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 52, 64-68.

Bonne, N., P. Shearer, M. Sharp, P. Clark e S. Raidal (2009). Assessment of recombinant beak and feather disease virus capsid protein as a vaccine for psittacine beak and feather disease. *Journal of General Virology*, 90, Pt 3, 640-647.

Borthwick, D. (2005). Threat Abatement Plan for Psittacine Beak and Feather Disease Affecting Endangered Psittacine Species *In Department of the Environment and Heritage website*. Department of the Environment and Heritage, Commonwealth of Australia. Acedido em Jun. 30, 2009, disponível em [http://fedlaw.gov.au/ComLaw/Legislation/LegislativeInstrument1.nsf/previewlodgmentattachments/81FCCCA0AB589760CA25718E00044623/\\$file/F2005L02255.htm](http://fedlaw.gov.au/ComLaw/Legislation/LegislativeInstrument1.nsf/previewlodgmentattachments/81FCCCA0AB589760CA25718E00044623/$file/F2005L02255.htm)

Chitty, J. (2005). Feather and Skin disorders. In N. Harcourt-Brown & J. Chitty (Eds.), *BSAVA Manual of Psittacine Birds, Second Edition* (pp. 191-204). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

CITES (2009). *Appendices I, II and III*. Acedido em Jul. 11, 2009, disponível em <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>.

Cooper, J. E. e G. J. Harrison (1994). Dermatology. In B. W. Ritchie, G. J. Harrison & L. R. Harrison (Eds.), *Avian Medicine: Principles and application*. (pp. 607-39). Lake Worth: Wingers Publishing.

Crosta, L. (2008). Neonatologia em Psitacídeos. In *Proceedins of Pós-Graduação em Medicina e Cirurgia de Animais Exóticos, Silvestres e de Zoo*. Lisboa. 5 de Abril de 2008

Dahlhausen, M. S. e M. S. Radabaugh (1997). Update on Psittacine beak and feather disease and avian polyomavirus – epidemiology and diagnostics [versão electrónica]. In *Proceedings of Mid-Atlantic States Association of Avian Veterinarians Conference: 18th Annual Avian Medicine and Surgery Conference, Williamsburg, Virginia, EUA*, pp. 51–57.

de Kloet, E. e S. R. de Kloet (2004). Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specific. *Archives of Virology*, 12, 2393-2412.

Doneley, R. J. T. (2003). Acute beak and feather disease in juvenile African grey parrots - an uncommon presentation of a common disease. *Australian veterinary journal*, 81, 206-207.

Forshaw, J. M. e F. Knight (2006). *Parrots of the World – An identification guide*. New Jersey: Princeton University Press.

Fudge, A. M. (2000). Laboratory reference ranges for selected avian, mammalian, and reptilian species. In: Fudge, A. M. (Ed.). *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets* (pp. 375-400). Philadelphia: WB Saunders.

Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira: Volume - 20 Paise-Penim (1960). Lisboa e Rio de Janeiro: Editorial Enciclopédia, Lda.

Gerlach, H. (1994). Viruses. In B. W. Ritchie, G. J. Harrison e L. R. Harrison (Eds.), *Avian Medicine: Principles and Application*, (pp. 862-948). Lake Worth: Wingers Publishing.

Greenacre, C. B. (2005). Viral diseases of companion birds. *Veterinary Clinics - Exotic Animal Practice*, 8, 85-105.

Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr, R. J. G. Dawson (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7, 1071–1075.

Grífos, J. (2008). Actualización sobre el picage en aves psitácidas. In *Proceedings of the I Curso de Medicina en Aves de Compañía, León, Espanha, 11-13 e 27-28 de Abril, 2008*, pp. 26-33.

Ha H. J., M. R. Alley, J. I. Cahill, L. Howe, B. D. Gartrell (2009). The prevalence of psittacine beak and feather disease virus infection in native parrots in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 57, 50-52.

Hattermann, K., C. Schmitt, D. Stoike e A. Mankertz (2003). Cloning and sequencing of Duck circovirus (DUCV). *Archives of Virology*, 148, 1471-1480.

Heath, L., D. P. Martin, L. Warburton, M. Perrin, W. Horsfield, C. Kingsley, E. P. Rybicki e A. L. Williamson (2004). Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in southern Africa. *Journal of Virology*, 78, 9277-9284.

Hess M., A. Scope e U. Heincz (2004). Comparative sensitivity of polymerase chain reaction diagnosis of psittacine beak and feather disease on feather samples, cloacal swabs and blood from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805). *Avian pathology*, 33, 477-481.

Hsu, C. M., C. Y. Ko e H. J. Tsaia (2006). Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in Taiwan. *Avian diseases*, 50, 348-353.

Johne, R., R. Raue, C. Grund, E. F. Kaleta e H. Muller, H. (2004). Recombinant expression of a truncated capsid protein of beak and feather disease virus and its application in serological tests. *Avian Pathology* 33, 328–336.

Kaltenboek, B., K. G. Kousoulas e J. Storz (1991). Detection and Strain Differentiation of *Chlamydia psittaci* Mediated by a Two-Step Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1969-1975.

Katoh, H., K. Ohya, H. Fukushi (2008). Development of novel real-time PCR assays for detecting DNA virus infections in psittaciform birds. *Journal of virological methods*, 154, 92-98.

Khalesi, B. (2007). *Studies of beak and feather disease virus infection*. Ph.D. Thesis. Murdoch University, Austrália.

Khalesi, B., N. Bonne, M. Stewart, M. Sharp e S. Raidal. (2005). A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from loriids. *Journal of General Virology*, 86, 3039-3046.

Kondiah, K., J. Albertyn e R. R. Bragg. (2005). Beak and feather disease virus haemagglutination activity using erythrocytes from African Grey parrots and Brown-headed parrots. *Onderstepoort journal of veterinary research*, 72, 263-265.

Latimer, K. S., W. L. Steffens, P. M. Rakich, B. W. Ritchie, F. D. Niagro, I. M. Kircher, P. D. Lukert (1992). Cryptosporidiosis in four cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200, 707-710.

Lennox, A. M. e Harrison G. J. (2006). The Companion Bird. In G. J. Harrison e T. L. Lightfoot (Eds.), *Clinical Avian Medicine*, (pp. 21-44). Palm Beach, Florida EUA : Spix Publishing.

Matias, R. (2002). *Aves exóticas que nidificam em Portugal Continental*. Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza

Macwhirter, P. (1998). Australian export ban. *Exotic Veterinary magazine*, 1, 13-14.

Molina, R., J. Grífol, A. Martínez-Silvestre, F. Padrós (2002). *Memorix: medicina de animales exóticos*. (1ª edição). Barcelona. Grass Ediciones.

Olsen, G. H. (2003). Oral biology and beak disorders of birds. *Veterinary clinics of North America - exotic animals practice*, 6, 505-521.

McOrist S., D. G. Black e D. A. Pass (1984). Psittacine beak and feather dystrophy in wild sulphurcrested cockatoos (*Cacatua galerita*). *Journal of wildlife diseases*, 20, 120-124.

Montesinos, A. (2007). El Picage en aves. In *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference / 42 Congreso Nacional AVEPA, Barcelona, Espanha, 17-21 de Outubro 2007*, pp. 481-483. Barcelona, Espanha: Cege.

Olsen G. e B. Speer (2009). Laboratory reporting accuracy of polymerase chain reaction testing for psittacine beak and feather disease virus. *Journal of avian medicine and surgery*, 23, 194-198.

Pepperberg, I.M. (2008). *Alex e eu* (1st Edition). Nova Iorque: HarperCollins Publishers.

Pepperberg, I. M. (2006). Grey parrot numerical competence: a review. *Animal cognition*, 9, 377-391.

Phalen, D. N. (2000). Avian viral diagnostics. In A. M. Fudge (Ed.), *Laboratory Medicine: Avian and exotic pets*, (pp. 111-123). Philadelphia, PA: WB Saunders

Phalen, D. N. (2006). Implications of viruses in clinical disorders. In G. J. Harrison e T. L. Lightfoot (Eds.), *Clinical Avian Medicine*, (pp. 721-46). Palm Beach: Spix Publishing.

Raidal S. R., C. L. McElnea e G. M. Cross (1993). Seroprevalence of psittacine beak and feather disease in wild psittacine birds in New South Wales. *Australian Veterinary Journal*, 70, 121-122

Rahaus, M. e M. H. Wolff (2003). Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus inside the population of captive psittacine birds

- in Germany. *Journal of Veterinary Medicine. B, infectious diseases and Veterinary public health*, 50, 368-371.
- Rahaus, M., N. Desloges, S. Probst, B. Loebbert, W. Lantermann e M. H. Wolff (2008b). Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds. *Veterinarni Medicina*, 53, 53-58.
- Raue, R., R. Johne, L. Crosta, M. Burkle, H. Gerlach e H. Muller (2004). Nucleotide sequence analysis of a C1 gene fragment of psittacine beak and feather disease virus amplified by real-time polymerase chain reaction indicates a possible existence of genotypes. *Avian Pathology*, 33, 41-50.
- Ritchie, B. W., F. D. Niagro, P. D. Lukert, W. L. Steffens e K. S. Latimer (1989). Characterization of a new virus derived from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology*, 171, 83-88.
- Ritchie, B. W., F. D. Niagro, K. S. Latimer, P. D. Lukert, W. L. Stephens, P. M. Rakich e N. Pritchard (1990a). Ultrastructural, protein composition, and antigen comparison of psittacine beak and feather disease virus purified from four genera of psittacine birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 26, 196-203
- Ritchie, B. W. (1995). Circoviridae. In B. W. Ritchie (Ed.) *Avian Viruses - Function and Control*, (pp. 223-252). Lake Worth: Wingers Publishing.
- Ritchie, P. A., I. L. Anderson e D. M. Lambert (2003b). Evidence for specificity of psittacine beak and feather disease viruses. *Virology*, 306, 109-115.
- Sanada, Y., N. Sanada e M. Kubo (1999). Electron microscopical observations of psittacine peak and peather pisease in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *The Journal of Veterinary Medical Science*, 61, 1063-1065.
- Schoemaker, N. J., G. M. Dorrestein, K. S. Latimer, J. T. Lumeij, M. L. K. Kik, M. H. van der Hage e R. P. Campagnoli (2000). Severe leukopenia and liver necrosis in young african grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian diseases*, 44, 470-478.
- Stanford, M. (2004). Interferon treatment of circovirus infection in grey parrots (*Psittacus e erithacus*).” *Veterinary record* 154: 435-436.
- Stewart, M. E., R. Perry, e S. R. Raidal (2006). Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathology*, 35, 86-92.
- Stewart, M. E., N. Bonne, P. Shearer, B. Kholesi, M. Sharp, S. Raidal (2007). Baculovirus expression of beak and feather disease virus (BFDV) capsid protein capable of self-assembly and haemagglutination. *Journal of virological methods*, 141, 181-187.
- Styles, D. K. (2005). A species based approach to avian medicine [versão electrónica]. In Proceedings of the North American Veterinary Conference, pp. 1226-1227. Orlando, Florida, EUA
- Todd, D. (2004). Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology*, 98, 169-174.
- Todd, D., A. N. Scott, E. Fringuelli, H. L. Shivrasprasad, D. Gavier-Widen e J. A. Smyth (2007). Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathology*, 36, 75-81.

Tomasek, O. e V. Tukac (2007). Psittacine Circovirus infection in parakeets of the genus *Eunymphicus* and treatment with β -(1,3/1,6)-D-glucan. *Avian Diseases*, 51, 989-991.

Ypelaar, I., M. R. Bassami, G. E. Wilcox e S. R. Raidal (1999). A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Veterinary Microbiology* 68, 141-148.

Anexo 1 – Espécies de *Psittaciformes* incluídos no Apêndice I da CITES.

As restantes espécies estão incluídas no Apêndice II.

Os Inseparáveis de Angola (*Agapornis roseicollis*), Periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), Caturras (*Nymphicus hollandicus*) e Periquitos de Colar (*Psittacula krameri*), são os únicos membros desta Ordem que não estão listados na CITES.

Cacatuidae - Catatuas

Cacatua goffini

Cacatua haematuropygia

Cacatua moluccensis

Cacatua sulphurea

Probosciger aterrimus

Loriidae – Lórios

Eos histrio

Vini ultramarina

Psittacidae - Amazonas, araras, periquitos, papagaios

Amazona arauiaca

Amazona auropalliata

Amazona barbadensis

Amazona brasiliensis

Amazona finschi

Amazona guildingii

Amazona imperialis

Amazona leucocephala

Amazona oratrix

Amazona pretrei

Amazona rhodocorytha

Amazona tucumana

Amazona versicolor

Amazona vinacea

Amazona viridigenalis

Amazona vittata

Anodorhynchus spp.

Ara ambiguus

Ara glaucogularis (Frequentemente comercializada com a designação incorrecta de *Ara caninde*)

Ara macao

Ara militaris

Ara rubrogenys

Cyanopsitta spixii

Cyanoramphus cookii

Cyanoramphus forbesi

Cyanoramphus novaezelandiae

Cyanoramphus saisseti

Cyclopsitta diophthalma coxeni

Eunymphicus cornutus

Guarouba guarouba

Neophema chrysogaster

Ognorhynchus icterotis

Pezoporus occidentalis
(possivelmente extinto)

Pezoporus wallicus

Pionopsitta pileata

Primolius couloni

Primolius maracana

Psephotus chrysopterygius

Psephotus dissimilis

Psephotus pulcherrimus
(possivelmente extinto)

Psittacula echo

Pyrrhura cruentata

Rhynchopsitta spp.

Strigops habroptilus

Anexo 2 – Valores de referência de hematologia para algumas espécies de psitacídeos (Fudge, 2000).

Hematologia	Papagaio cinzento africano (<i>Psittacus erithacus</i>)	Catatuas	Papagaios amazona (<i>Amazona</i> sp.)	Papagaios ecléticos (<i>Ecletus</i> sp.)
Hematócrito (%)	43-55	42-54	45-55	45-55
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	2,4-4,5	2,0-4,0	2,5-4,5	2,7-3,8
Hb (g/dl)	11,0-16,0	12,0-16,0	12,2-15,9	13,5-16,0
MCV (fl)	90-180	120-175	160-175	125-175
MCH (pg)	28-52	35-55	47,2-56,8	40-50
MCHC (g/dl)	23-33	28-33	29,1-31,9	29-32
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	5,0-15,0	5,0-13,0	6,0-17,0	9,0-20,0
Heterófilos (%)	45-75	15-64	30-75	35-50
Linfócitos (%)	20-50	29-83	20-65	45-65
Monócitos (%)	0-3	0-9	0-3	1-7
Eosinófilos (%)	0-2	0	0-1	1
Basófilos (%)	0-5	0-3	0-5	0-3
<i>Ratio</i> H:L	-	0-2	-	1-2